

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

HÉLIO DANIEL RIBEIRO ROCHA

Perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da ilha de  
Santiago, Cabo Verde, a inseticidas

RECIFE

2014

HÉLIO DANIEL RIBEIRO ROCHA

**Perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da ilha de Santiago, Cabo Verde, a inseticidas**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito principal para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos

Coorientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes

RECIFE

2014

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- R672p      Rocha, Hélio Daniel Ribeiro.  
                Perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da ilha de Santiago, Cabo Verde, a inseticidas / Hélio Daniel Ribeiro Rocha. - Recife: s. n, 2014.  
                74 p. : ilus., tab.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.  
                Orientadores: Maria Alice Varjal de Melo Santos, Constância Flávia Junqueira Ayres.
1. *Aedes*. 2. Insetos Vetores. 3. Resistência a Inseticidas. 4. Cabo Verde. I. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. II. Ayres, Constância Flávia Junqueira. III. Título.

HÉLIO DANIEL RIBEIRO ROCHA

**Perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da ilha de Santiago, Cabo Verde, a inseticidas**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública no Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito principal para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 20/01/2014

**Banca examinadora**

---

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos  
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha  
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Liliane Barbosa Amorin  
Secretária de Saúde do Município de Jaboatão dos Guararapes/ Centro de Vigilância Ambiental, Brasil

**Dedico este trabalho às pessoas que sempre me apoiaram na minha caminhada:**

À Joanita Cristina Rodrigues, minha mãe e ao Ricardino Santos Afonso, meu pai,

A Hélvio Rocha, meu querido irmão e a minha tia Filomena Ribeiro,

Aos meus avós Pedro João Ribeiro e Cristina Ribeiro (*in memoriam*),

Ao grupo de investigação em doenças tropicais da Universidade Jean Piaget de Cabo Verde (GIDTPiaget), principalmente a coordenadora Dra. Maria Lara Ferrero Gómez e a Dra. Evanilda Tavares (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por mais essa bênção na minha vida e por me manter sempre firme no meu caminho.

À Dra. Maria Alice Varjal, pelas orientações e pelo conhecimento compartilhado durante esses dois anos.

À Dra. Constância Ayres, pelas orientações e pelo apoio durante esses dois anos.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Departamento de Entomologia pelo apoio institucional e pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Ana Paula Araújo e ao Dr. Marcelo Paiva pelo apoio na realização dos experimentos.

Agradecimento especial a todos os membros do grupo de investigação em doenças tropicais da Universidade Jean Piaget de Cabo Verde (GIDTPiaget).

À Dra. Maria Lara Gómez, pelo incansável apoio aos trabalhos realizados.

Ao Ministério da Saúde de Cabo Verde e as Delegacias de Saúde dos municípios da ilha de Santiago, pela colaboração nos trabalhos de coleta das amostras.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo que viabilizou a realização deste projeto.

Por fim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização desse trabalho.

ROCHA, H. D. R. **Perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* da Ilha de Santiago, Cabo Verde, a inseticidas**. 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

## RESUMO

Em Cabo Verde, arquipélago situado na Costa Ocidental Africana, os primeiros casos de dengue ocorreram em 2009, com a notificação de mais de 21.000 casos, a maioria desses registrados na Ilha de Santiago. O mosquito *Aedes aegypti* foi identificado como vetor, e ações para seu controle, usando os inseticidas *temephos* (larvicida) e a deltametrina (adulticida), têm sido implementadas. Objetiva-se com esse trabalho avaliar o atual *status* de suscetibilidade a inseticidas e caracterizar os mecanismos de resistência nessa população. Amostras de *A. aegypti* da ilha de Santiago foram coletadas através de armadilhas de oviposição, para o estabelecimento de uma população a ser analisada. Foram realizados bioensaios do tipo dose diagnóstica, usando garrafas impregnadas com doses únicas dos adulticidas *malathion* (organofosforado), deltametrina (piretróide) e cipermetrina (piretróide), e bioensaios do tipo dose resposta, usando múltiplas concentrações dos inseticidas *temephos* (organofosforado), *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (bactéria entomopatogênica) e *diflubenzuron* (inibidor de síntese de quitina). Para a investigação dos mecanismos de resistências, foram realizados testes bioquímicos com substratos específicos para quantificar a atividade das enzimas glutatona S-transferases, esterases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e PNPA) e oxidases de função mista, ligadas a detoxificação de xenobióticos, e a taxa de inibição da acetilcolinesterase ligada a insensibilidade do sítio alvo. Pesquisou-se também a presença de mutações do tipo *kdr* (*knock-down resistance*) associadas à resistência a piretróides, pela análise da sequência dos exons 20 e 21 no gene do canal de sódio. Nos resultados dos bioensaios constatou-se que a população de *A. aegypti* investigada apresenta resistência aos piretróides deltametrina e cipermetrina (mortalidade  $<80\%$ ) e ao organofosforado *temephos* ( $RR_{90}=4$ ), mas é suscetível ao *malathion* (mortalidade  $\geq 98\%$ ), *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* ( $RR_{90}=0.8$ ) e ao *diflubenzuron* ( $RR_{90}=2,2$ ). Em relação a atividade das enzimas ligadas ao processo de detoxificação, foram detectadas alterações nas glutatona S-transferases (25%), oxidases de função mista (18%), esterase- $\alpha$  (19%) e esterase- $\beta$  (17%). A taxa de inibição da acetilcolinesterase (6%) e a atividade da esterase-PNPA (7%) mostraram que estas estão inalteradas. Nenhuma das mutações do tipo *kdr* pesquisadas foi detectada. Estes resultados permitem concluir que a população de *A. aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, é suscetível aos inseticidas, excetuando os piretróides testados e o *temephos*, usados no seu controle; e que ela apresenta alterações em enzimas detoxificadoras que poderão estar implicadas na resistência a esses compostos.

**Palavras-chave:** Aedes, Cabo Verde, enzimas, mutações, inseticidas, resistência.

ROCHA, H. D. R **Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cape Verde, to insecticides**. 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

### ABSTRACT

Cape Verde, an archipelago located on the West African Coast, recorded the first cases of dengue in 2009 in an epidemic with more than 21,000 reported cases. The worst affected area was Santiago Island. The mosquito *Aedes aegypti* was identified as the vector and actions for its control, using the insecticides temephos and deltamethrin, have been employed. This study aimed to assess the current status of insecticide susceptibility and characterize the mechanisms of resistance in this population. *A. aegypti* samples from Santiago Island were submitted to bioassays with adulticide *malathion*, deltamethrin and cypermethrin in diagnostic-dose tests, and to temephos, *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) and diflubenzuron in dose-response tests. Biochemical assays were performed with specific substrates in order to quantify the activity of the enzymes glutathione S-transferases, esterases ( $\alpha$ ,  $\beta$  and PNPA), mixed function oxidases and the inhibition rate of acetylcholinesterase. Mutations in the sodium channel gene (knock-down resistance-kdr) were studied by sequencing a fragment of exons 20 and 21. The results demonstrated that the population is resistant to deltamethrin, cypermethrin (mortality < 80%) and temephos ( $RR_{90}= 4$ ), but is susceptible to *malathion* (mortality  $\geq 98\%$ ), Bti ( $RR_{90}= 0.8$ ) and diflubenzuron ( $RR_{90}=2.2$ ). Changes in the activity were detected for glutathione S-transferases (25%), mixed function oxidases (18%),  $\alpha$ -esterase (19%) and  $\beta$ -esterase (17%), and no kdr mutation was detected. It is possible to conclude that the *A. aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, is susceptible to insecticides evaluated, except for pyrethroids and temephos, used in its control, and present changes in detoxification enzymes may be associated to such mechanisms of resistance.

**Keywords:** Aedes, Cape Verde, enzymes, mutations, insecticides, resistance.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> -Fases do ciclo biológico dos mosquitos .....	16
<b>Figura 2</b> -Esquema do escudo (A), das patas (B) e do abdômen (C) de <i>Aedes aegypti</i> .....	19
<b>Figura 3</b> -Arquipélago de Cabo Verde .....	20
<b>Figura 4</b> -Presença de <i>Aedes aegypti</i> e da dengue nos países africanos .....	23
<b>Figura 5</b> -Estrutura molecular do organoclorado diclorodifeniltricloroetano .....	26
<b>Figura 6</b> -Representação esquemática da estrutura molecular do <i>malathion</i> .....	26
<b>Figura 7</b> -Representação esquemática da estrutura molecular do <i>temephos</i> .....	27
<b>Figura 8</b> -Estrutura molecular do piretróide deltametrina .....	28
<b>Figura 9</b> -Estrutura molecular do piretróide cipermetrina .....	28
<b>Figura 10</b> -Estrutura molecular do diflubenzuron .....	30
<b>Figura 11</b> -Representação esquemática da proteína do canal de sódio e pontos de mutação...36	
<b>Figura 12</b> -Mapa do arquipélago de Cabo Verde e da ilha de Santiago .....	39
<b>Figura 13</b> -Ovitrapa, adaptada do modelo de FAY; PERRY (1965) usada para a coleta de amostras de ovos de <i>Aedes aegypti</i> da ilha de Santiago, Cabo Verde.....	40
<b>Figura 14</b> -Cuba com larvas de <i>Aedes</i> spp. da ilha de Santiago, mantidas em insetário em cubas com água desclorada e ração de gato para alimentação .....	41
<b>Figura 15</b> -Gaiolas de contenção com <i>Aedes aegypti</i> da ilha de Santiago, Cabo Verde .....	42
<b>Figura 16</b> -Palheta umedecida com infusão de graminea e com ovos de <i>Aedes aegypti</i> .....	42
<b>Figura 17</b> -Garrafas impregnadas com dose diagnóstica de adulticida .....	45
<b>Figura 18</b> -Eletroferograma destacando a mutação sinonima no codón 982, no canal de sódio de <i>Aedes aegypti</i> da ilha de Santiago.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -Destribuição de ovos de <i>Aedes aegypti</i> nos diferentes municípios da ilha de Santiago .....	50
<b>Tabela 2</b> -Concentrações letais do <i>temephos</i> e do <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovariedade <i>israelensis</i> para 50 (CL <sub>50</sub> ) e 90% (CL <sub>90</sub> ) de larvas de terceiro estágio de <i>Aedes aegypti</i> da ilha de Santiago e respetivas razões de resistência (RR).....	51
<b>Tabela 3</b> -Concentração do <i>diflubenzuron</i> para inibição de emergência para 50 e 90 % de indivíduos de <i>Aedes aegypti</i> da ilha de Santiago, Cabo Verde, e respectivas Razões de Resistências (RR). ....	51
<b>Tabela 4</b> -Mortalidade (%) de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> de Santiago, Cabo Verde, frente aos adulticidas deltametrina, cipermetrina e <i>malathion</i> .....	52
<b>Tabela 5</b> -Atividade das enzimas esterases ( $\alpha$ , $\beta$ e PNPA), glutational S-transferases, oxidases de função mista e acetilcolinesterase na população de <i>Aedes aegypti</i> da ilha de Santiago e o percentual de indivíduos com alteração em comparação com o percentil 99 da Rockeffeler..	54

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AChE – Enzima acetilcolinesterase;  
AChI – Atividade da acetilcolinesterase na presença de inibidor;  
ACTH – Iodeto de acetiltiocolina;  
Bti - *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis*;  
CDNB – 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno;  
CHIKV – Vírus Chikungunya;  
CL<sub>50/90</sub> – Concentração letal para 50% e 90% de larvas de *Aedes aegypti*;  
CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães;  
DD – Dose diagnóstica;  
DDT – Diclorodifeniltricloroetano;  
DENV – Vírus Dengue;  
DHF – Febre da dengue hemorrágica;  
DR – Dose Resposta;  
DSS – Síndrome do *Shock* da Dengue;  
DTNB – Ácido 5,5 ditiobis (2-nitro-benzoico);  
EST – Esterase;  
GABA – Ácido gama-aminobutírico;  
GSH – Glutathione reduzida  
GST – Glutathione S-transferases;  
IE – Inibição de emergência;  
INE – Instituto nacional de estatísticas (Cabo Verde);  
Kdr – *knock-down resistance*;  
MFO – Oxidase de função mista;  
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato;  
*Nav* – Gene do canal de sódio  
OMS – Organização Mundial da Saúde;  
OVT – Ovitrapas;  
Pb – Pares de base  
PCR – *Polymerase chain reaction*  
PNPA – 4-nitrofenil acetato;  
RR – Razão de resistência;

TMBZ – 3,3,5,5 dihidrocloro de tetrametil benzidina;

YFV – Vírus da febre amarela.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Justificativa .....</b>	<b>14</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Aspectos da biologia dos mosquitos .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Aspectos da biologia de <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 <i>Aedes aegypti</i> em Cabo Verde .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Importância epidemiológica do mosquito <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Controle vetorial .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6 Inseticidas químicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.7 Inseticidas biológicos usados no controle de mosquitos .....</b>	<b>30</b>
<b>2.8 Resistência a inseticidas químicos em <i>Aedes aegypti</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>2.9 Mecanismos de resistência a inseticidas .....</b>	<b>33</b>
<b>3 PERGUNTA CONDUTORA .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Hipótese .....</b>	<b>37</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Geral .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Específicos .....</b>	<b>38</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Desenho do estudo .....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 Área e período do estudo .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3 População e colônias de <i>Aedes aegypti</i> .....</b>	<b>39</b>
5.3.1 Colônia Rockefeller do mosquito <i>A. aegypti</i> .....	39
5.3.2 População da colônia Rec-Lab .....	40
5.3.3 População de <i>Aedes aegypti</i> da ilha de Santiago.....	40
<b>5.4 Estabelecimento da população de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório .....</b>	<b>41</b>
<b>5.5 Bioensaios - inseticidas com atividade para formas jovens do mosquito .....</b>	<b>42</b>
5.5.1 Bioensaio usando o temephos e <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovariedade <i>israelensis</i>	43
5.5.2 Bioensaio usando o <i>diflubenzuron</i> .....	44
<b>5.6 Testes de suscetibilidade de adultos .....</b>	<b>44</b>
<b>5.7 Testes bioquímicos.....</b>	<b>45</b>
<b>5.8 Pesquisa da mutação no canal de sódio do tipo <i>kdr</i>.....</b>	<b>46</b>

5.8.1 Extração de DNA.....	47
5.8.2 Reação de PCR .....	47
5.8.3 Sequenciamento e análise para identificação dos pontos de mutação.....	48
<b>6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>49</b>
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>7.1 Coleta de amostras de ovos de <i>Aedes aegypti</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>7.2 Suscetibilidade a inseticidas com atividade para formas jovens do mosquito ...</b>	<b>50</b>
<b>7.3 Suscetibilidade a adulticidas .....</b>	<b>51</b>
<b>7.4 Atividade de enzimas de detoxificação e sítio-alvo .....</b>	<b>52</b>
<b>7.5 Frequência de mutações no canal de sódio do tipo <i>kdr</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>9 CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE A - Resumo dos principais resultados para os bioensaios.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Existem diversos patógenos causadores de doenças que são transmitidos ao homem através de insetos vetores, e algumas dessas doenças têm afetado grandes massas populacionais ao redor do globo. Entre essas doenças, destaca-se a dengue, que é considerada a arbovirose de maior importância para a saúde pública no cenário mundial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011a; PINHEIRO; CORBER, 1997). Estima-se que mais de 40% da população mundial viva em áreas de risco para esta doença e que, nos últimos anos, sua incidência tenha variado de 50 a 270 milhões de casos/ano (FERREIRA, 2012a; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

A dengue é uma doença infecciosa, febril e aguda, causada por um vírus de RNA do gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviviridae*. Os principais vetores são mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti*, que quando infectados com um dos quatro sorotipos virais (DENV-1 a 4) podem, através de picadas, transmitir a doença ao homem (FERREIRA; SOUSA, 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009 2013).

Embora constitua um grande problema de saúde pública, até o momento não se tem disponível uma vacina eficaz ou tratamento específico para a dengue. Por esta razão, o controle da doença está centrado em ações de controle dos vetores (KYLE; HARRIS, 2008).

Na maioria das vezes, os programas de controle utilizam como estratégia de primeira escolha o uso de inseticidas, diante da possibilidade de causar um impacto imediato nas populações de vetores em campo. Os inseticidas químicos da classe dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides são os mais comumente usados (BISSET, 2002; HEMINGWAY; RANSON, 2005). No entanto, o fenômeno de resistência tem sido detectado para a maioria desses compostos. Subjacentes a essa resistência encontram-se três principais mecanismos: redução na penetração do inseticida pelo espessamento da cutícula do inseto, alterações quantitativas e/ou qualitativas das enzimas ligadas ao processo de detoxificação e alterações do sítio alvo de ação dos inseticidas (BRAGA; VALLE, 2007b; BROGDON; MCALLISTER, 1998a; HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; ROSE, 2001).

Vários estudos demonstram que a resistência aos inseticidas químicos tem-se tornado cada vez mais frequente e disseminada em populações de *A. aegypti*, em várias partes do mundo. Os inseticidas das classes dos organofosforados e piretróides são os mais implicados nos casos de resistência descritos (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; LIMA et al., 2011; MARCOMBE et al., 2012; MONTELLA et al., 2007).

No arquipélago de Cabo Verde, país situado na costa ocidental africana, o mosquito *A. aegypti* é considerado, até o momento, o único vetor do vírus Dengue (DENV). Ele esteve envolvido na primeira epidemia da doença ocorrida em finais de 2009, atingindo mais de 21.000 pessoas (CABO VERDE, 2011; FRANCO et al., 2010). Após a epidemia, medidas têm sido tomadas para efetuar o controle das populações de *A. aegypti*, recorrendo ao uso de inseticidas químicos como o *temephos* e a deltametrina (CABO VERDE, 2012a).

Neste sentido, o presente estudo teve como proposta realizar uma avaliação do *status* de suscetibilidade da população de *A. aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a inseticidas químicos e biológicos com potencial de uso ao nível local. As informações geradas com este estudo serão relevantes para o programa de controle populacional de *A. aegypti* no arquipélago de Cabo Verde.

## 1.1 Justificativa

No arquipélago de Cabo Verde, o mosquito *A. aegypti* foi detectado pela primeira vez em 1931, através de estudos realizados pela então Escola de Medicina Tropical de Portugal (RIBEIRO et al., 1980), e sua presença foi reconfirmada em todas as ilhas em estudos posteriores (ALVES et al., 2010). No entanto, apenas no final do ano de 2009 foram registrados os primeiros casos de dengue, seguidos por uma epidemia com mais de 21.000 notificações (CABO VERDE, 2010).

As ilhas do Fogo, Maio e Santiago foram as mais afetadas, com destaque para esta última onde ocorreu mais de 70% dos casos (CABO VERDE, 2011). Análises realizadas em amostras de pacientes durante a epidemia revelaram o envolvimento do sorotipo DENV-3 (FRANCO et al., 2010). No decorrer da epidemia foram tomadas medidas de controle direcionadas ao mosquito *A. aegypti*, com o uso de inseticidas químicos para a redução da sua densidade. O *temephos* e a deltametrina foram os inseticidas utilizados: o primeiro como larvicida e o segundo como adulticida (CABO VERDE, 2012a).

No decurso da epidemia, a população de *A. aegypti* da ilha de Santiago foi investigada quanto a sua suscetibilidade aos inseticidas (adulticidas) deltametrina, permetrina, propoxur, fenitrothion, lambda-cyhalothrina e DDT, revelando resistência apenas para este último composto. Não obstante à resistência detectada, nenhum estudo foi realizado no sentido de determinar qual ou quais os mecanismos de resistência que estariam envolvidos (DIA et al., 2012).



Considerando que os *temephos* e a deltametrina continuam sendo usados para o controle de *A. aegypti* em Cabo Verde por pelo menos três anos consecutivos, faz-se necessário conhecer o atual *status* de suscetibilidade da população local a estes compostos, com perspectiva de potencializar as ações de controle e impedir o estabelecimento da resistência em campo. Além disso, este estudo também tem por objetivo avaliar a suscetibilidade desta população a outros agentes de controle que podem ser úteis no manejo da resistência.

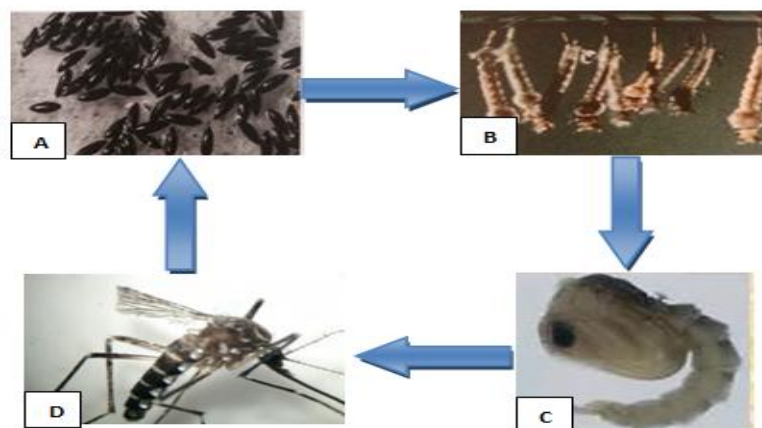
## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Aspectos da biologia dos mosquitos

Os mosquitos são insetos da ordem Diptera, pertencentes à família Culicidae e são encontrados em praticamente todas as regiões do mundo, principalmente nas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas permitem seu rápido desenvolvimento e sobrevivência (CLEMENTS, 2000).

No seu ciclo de vida, os mosquitos passam por uma metamorfose completa, compreendendo as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). As fases jovens (ovo, larva e pupa) se desenvolvem em meio aquático, enquanto os adultos são alados e colonizam o ambiente terrestre (CLEMENTS, 2000; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; HAGEDORN, 2005).

**Figura 1**-Fases do ciclo biológico dos mosquitos



**Fonte:** Adaptado de Becker et al. (2003)

**Legenda:** (A) ovos; (B) larvas; (C) pupa e (D) Mosquito adulto

As fêmeas dos mosquitos são capazes de produzir de 50 a 500 ovos em uma única postura. Podem fazê-lo diretamente na superfície da água ou em locais úmidos, como por exemplo, na margem de rios e nas superfícies de substratos flutuantes ou fixos, passíveis de inundação ou preenchimento por água pluvial. Os ovos podem ser depositados de forma individual ou em conjunto, dependendo do gênero do mosquito (BECKER et al., 2003; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

Os ovos de alguns gêneros de mosquitos possuem a capacidade de resistir por um longo período à dessecação sem perder a sua viabilidade, devido a capacidade que têm de

conservar água no seu interior. Nessas condições, o embrião entra numa fase de dormência, conhecida como quiescência ou diapausa. Esta última é geneticamente programada, e a eclosão da larva é suspensa temporariamente, diante de condições ambientais adversas, possibilitando sua sobrevivência, por exemplo, os ovos de *A. aegypti* podem se manter viáveis por mais de oito meses na ausência de água, sendo esta uma característica estratégica para a manutenção de populações em locais com grandes períodos de seca (BECKER et al., 2003; CLEMENTS, 2000; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). O desenvolvimento embrionário tem início logo após a deposição dos ovos fecundados e pode levar de 24 a 48 horas até a eclosão das larvas (CLEMENTS, 2000).

As larvas dos mosquitos são encontradas sempre em ambientes aquáticos, preferencialmente em coleções de água com pouco ou nenhum movimento. Possuem aspecto vermiforme, coloração variada e o corpo encontra-se dividido em cabeça, tórax e abdômen. No segmento VIII do abdômen encontra-se o sifão respiratório nos culicídeos ou placas esclerotizadas (aparato espiracular) nos anophelinos, que desempenham papel primordial na captação de oxigênio para o processo de respiração. As larvas caracterizam-se por apresentarem vários pares de cerdas espelhadas pelo corpo, com funções sensoriais e auxílio na flutuação (BECKER et al., 2003; CLEMENTS, 2000; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

A alimentação das larvas se dá pela ingestão de microorganismos: algas, pequenos invertebrados e partículas derivadas da deteriorização de matéria orgânica presente na água. Essa alimentação é realizada via filtração não seletiva das partículas suspensas na água, ou pela resuspensão, raspagem ou desfiamento de partículas (BECKER et al., 2003; CLEMENTS, 2000; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). Durante o desenvolvimento a larva sofre um processo de muda de crescimento (ecdise), passando por quatro estágios larvais (L1-4), cujo tempo necessário para sua finalização varia de sete a 30 dias e dependerá, principalmente, da disponibilidade de alimento e temperatura da água (BECKER et al., 2003).

Após a fase larval os mosquitos entram na fase de pupa, e é neste momento que acontece o processo de metamorfose, que vai culminar na emergência de um mosquito adulto (BECKER et al., 2003). Assim como as larvas, as pupas também são móveis, entretanto não se alimentam. Esta fase, ao contrário das demais, é fortemente regulada por hormônios e portanto sofre pouca influência das variações ambientais de temperatura e/ou fotoperíodo, durando de dois a três dias (CLEMENTS, 2000).

Os mosquitos adultos são caracterizados por possuir um corpo alongado, dividido em cabeça, tórax e abdômen, longas pernas, um par de asas e antenas (BECKER et al., 2003). Ambos os sexos dos mosquitos adultos utilizam carboidratos (glicose, sacarose, maltose e

frutose), provenientes principalmente do néctar das flores e seiva vegetal, como fonte de energia. As fêmeas da maioria das espécies também são hematófagas e o sangue é usado como fonte de aminoácidos e proteínas essenciais ao processo de maturação dos ovos (CLEMENTS, 2000; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

A localização de um hospedeiro para a realização do repasto sanguíneo é uma tarefa fundamental e baseia-se em estímulos olfativos (comunicação química), visuais e térmicos. Nas antenas existem receptores que respondem a determinados odores do hospedeiro, tais como o dióxido de carbono, ácido láctico e acetona (BECKER et al., 2003). Devido ao seu comportamento hematofágico, algumas espécies são vetores de agentes patogênicos de determinadas doenças, como por exemplo o vírus Dengue (dengue), o vírus da febre amarela urbana (febre amarela), o verme filarial *Wuchereria bancrofti* (filariose bancroftiana) e o protozoário *Plasmodium* sp (malária) (BECKER et al., 2010; CLEMENTS, 2000; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

## 2.2 Aspectos da biologia de *Aedes aegypti*

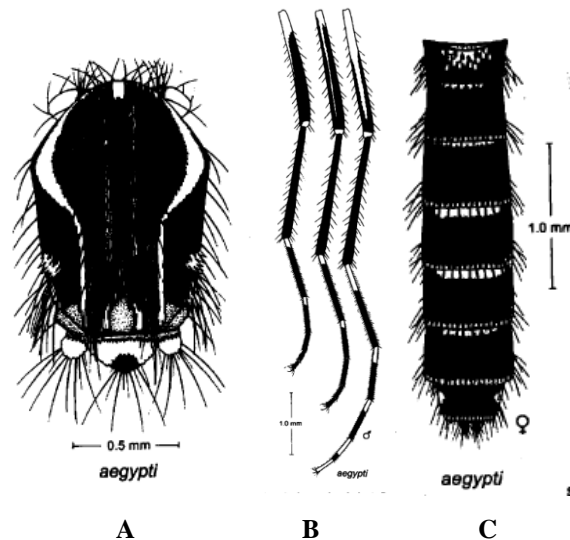
Os mosquitos são divididos em duas grandes subfamílias: a Anophelinae e a Culicinae. A família Culicinae é formada por várias tribos, entre elas a Aedini que reúne os mosquitos do gênero *Aedes*, de grande importância do ponto de vista epidemiológico. Nesse gênero destaca-se o subgênero *Stegomyia* (Theobald), cuja espécie *Aedes aegypti* é a de maior importância no contexto da Saúde Pública (BECKER et al., 2003; HUANG, 2004). Dentro dessa espécie é apontada a existência de subespécies, sendo *Aedes aegypti formosus* descrita como a forma silvestre e *Aedes aegypti aegypti* a mais doméstica (HUBER et al., 2008). Primeiramente descrita no Egito, esta espécie tem se adaptado aos ambientes urbanizados, sobretudo em países das regiões tropicais (BRAGA; VALLE, 2007a; HUANG, 2004; HUBER et al., 2008; WERE, 2012).

O mosquito *A. aegypti* caracteriza-se por ser antropofílico e possuir hábito diurno. Geralmente alimenta-se e oviposita ao amanhecer e no período vespertino, próximo ao crepúsculo. Morfologicamente, *A. aegypti* caracteriza-se por ser um mosquito de tamanho médio, de cor escura, ornamentado com escamas claras prateadas na cabeça, no escudo, nas pernas e no abdome (Figura 2) (BECKER et al., 2010; CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 1962; HUANG, 2004).

Os criadouros preferenciais de *A. aegypti* são recipientes preenchidos com água das chuvas ou aqueles utilizados para o armazenamento de água no uso doméstico, em mal estado

de conservação. Criadouros naturais, como ocos em árvores contendo água, escavações em rocha, bambu e folhas de algumas plantas (bromélias, bananeira, abacaxi e lírio) são também passíveis de colonização (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; HUANG, 2004). Essa espécie apresenta preferência a ovipositar em determinada superfície, tendo em vista as seguintes características do material: a porosidade, a textura e a cor (FAY; PERRY, 1965).

**Figura 2**-Esquema do escudo, patas e abdômen de *Aedes aegypti*



Fonte: Huang (2004).

**Legenda:** A – escudo; B – patas; C- abdômen; de *Aedes aegypti* mostrando a localização das escamas brancas.

A densidade populacional de *A. aegypti* pode ser fortemente influenciada pela presença de chuvas, aumentando nos períodos de maior precipitação e diminuindo nas estações mais secas. Entretanto, nas estações secas são mantidas populações residuais desta espécie a custa de criadouros artificiais que não são diretamente dependentes das chuvas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; RIBEIRO et al., 1980; SURTEES, 1967). Mudanças demográficas, intensas migrações, desenvolvimento dos transportes, crescimento desordenado das cidades e condições precárias ou inadequadas de saneamento básico são, também, apontados como fatores que potencializam a proliferação dessa espécie de mosquitos (BRAGA; VALLE, 2007a; SURTEES, 1967).

*A. aegypti* encontra-se amplamente distribuída nos países do continente africano onde a deficiência no planejamento urbano, e de gestão de resíduos, estão associadas à multiplicação de criadouros e, conseqüentemente, proliferação do mosquito (KAMGANG et al., 2010; SURTEES, 1967; WERE, 2012). Em Camarões, país situado na costa ocidental africana, por exemplo, estudos realizados demonstraram que a densidade de *A. aegypti* é significativamente elevada nas áreas onde há grande densidade de construções, sendo que a

maioria dos criadouros positivos são peridomiciliares, constituídos principalmente por pneus e recipientes descartáveis (KAMGANG et al., 2010).

### 2.3 *Aedes aegypti* em Cabo Verde

Cabo Verde é um país arquipelágico, constituído por nove ilhas habitadas (Santo Antão, São Vicente, São Nicolau, Sal, Boavista, Maio, Santiago, Fogo e Brava), uma desabitada (Santa Luzia) e treze ilhéus. Está situado na costa ocidental do continente africano a cerca de 450 km a oeste do Senegal (Figura 3), com uma área terrestre total de 4.033km<sup>2</sup> e uma zona econômica exclusiva de 734.000 km<sup>2</sup>. As ilhas são de origem vulcânica e possuem relevos geralmente acidentados atingindo grande altitudes (Pontos mais altos: Fogo 2.829 m, Santo Antão 1.979 m, Santiago 1.395 m e São Nicolau 1.340 m) e um vulcão ativo (ilha do Fogo – última erupção em 1995). As três ilhas mais orientais (Sal, Boa Vista e Maio) são relativamente planas e áridas (CABO VERDE, 2004).

**Figura 3-**Arquipélago de Cabo Verde



**Fonte:** Google earth 2013

**Legenda:** A – Costa ocidental africana: o arquipélago de Cabo Verde em destaque; B- As diferentes ilhas do arquipélago de Cabo Verde.

O arquipélago possui um clima do tipo subtropical seco, com apenas duas estações, a chuvosa (Junho a Outubro) e a seca. As precipitações são irregulares e por vezes torrenciais, mas, de forma geral, são consideradas insuficientes: não ultrapassando por ano um total de 300 mm nas zonas situadas a menos de 400 m de altitude, e os 700 mm nas situadas a mais de 500 m. A temperatura média anual do país fica em torno de 25° C: não excedendo 30° C, no período mais quente e não chegando a menos de 13° C, nos meses mais frios; o mês de Setembro apresenta as mais elevadas temperaturas e Fevereiro as mais baixas (CABO VERDE, 2004).

A população residente é de cerca de meio milhão de habitantes, sendo a ilha de Santiago a mais povoada (56%), seguida da ilha de São Vicente (16%) e da ilha de Santo Antão (9%). Em sua maioria, as pessoas vivem nas zonas urbanas (62%). A cidade da Praia é a capital do país e está situada na ilha de Santiago, é também a maior cidade, com cerca de 132.000 habitantes (INSTITUTO NACIONAL DE ESTATISTICAS, 2010).

Em Cabo Verde, o mosquito *A. aegypti* foi relatado pela primeira vez em 1931 na ilha de São Vicente e posteriormente nas restantes ilhas. Estudos, mais recentes reconfirmaram a sua presença nas ilhas de Santiago, Fogo e Brava (ALVES et al., 2010; RIBEIRO et al., 1980). De forma geral a fauna entomológica de Cabo Verde é considerada pobre. Dadas as condições climáticas desse arquipélago, o mosquito *A. aegypti* tem conseguido se manter em estreita associação com o homem, estando sua população distribuída em criadouros artificiais que são predominantemente encontrados nas áreas peridomiciliares. Essa espécie é encontrada em maior abundância nas ilhas com maior urbanização e que possuem vários depósitos artificiais de água, como cisternas, tambores com água de reserva, recipientes com água para uso doméstico, tanques de cimento para uso agrícola e sistemas de transporte de água a céu aberto para agricultura (lavadas) (RIBEIRO et al., 1980). Além de *A. aegypti* outra espécie de *Aedes*, *Aedes caspius* também conhecido como *Aedes africanus*, tem sido encontrada nas ilhas do arquipélago de Cabo Verde (ALVES et al., 2010). Embora essa espécie seja apontada como um dos vetores do vírus Dengue em algumas regiões do continente africano (WERE, 2012), ela não foi referenciada como vetor dessa arbovirose no decorrer da epidemia vivenciada em Cabo Verde (DIA et al., 2012).

## **2.4 Importância epidemiológica do mosquito *Aedes aegypti***

O mosquito *A. aegypti* é considerado o principal vetor do DENV, vírus chikungunya (CHIKV) e do vírus da febre amarela urbana (YFV). No entanto, o seu papel na transmissão do DENV ganha grande importância por ele ter se tornado um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial, que afeta principalmente as regiões tropicais e subtropicais (HUANG, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011a). Em 1906 Bancroft demonstrou que *A. aegypti* era o vetor do DENV, fato confirmado por Agramonte e Simmons nos anos 1906 e 1931, respectivamente (HALSTEAD, 1974). Outras espécies do gênero *Aedes* são também indicadas como potenciais vetores desse vírus, como *A. albopictus*, *A. africanus* e *A. luteocephalus* (BRAGA; VALLE, 2007b; WERE, 2012).

Em termos clínicos, a dengue, em sua forma clássica, é caracterizada por febre alta indiferenciada, intensa dor de cabeça, dor na retro-orbital dos olhos, artralgia e erupção cutânea, mas raramente causa a morte. No entanto, as formas mais severas, febre da dengue hemorrágica (DHF) e Síndrome do *Shock* da Dengue (DSS), apresentam altas taxas de mortalidade (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005). A doença tem por agente etiológico um vírus de RNA, do gênero *Flavivirus*, pertencente família *Flaviviridae*, dividido em quatro tipos sorológicos (FERREIRA; SOUSA, 2003). Mais recentemente, em amostras de pacientes doentes em Malásia foi apontado a possibilidade da existência de um quinto tipo sorológico do vírus (NORMILE, 2013).

Esta arbovirose atinge, na atualidade, mais de 125 países e estima-se que 2,5 a 3,6 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco. A nível mundial, estima-se que ocorrem entre 50 a 270 milhões de casos, com registro de 21.000 óbitos por ano (FERREIRA, 2012b; GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011a). No continente africano (Figura 4), epidemias de dengue têm ocorrido desde o século XIX. Um estudo retrospectivo realizado em 1956 sugeriu que a primeira epidemia ocorreu em Durban, África do Sul, em 1927 (KOKERNOT RH, 1956). Entre 1960 e 2010 foram laboratorialmente confirmados surtos em 15 países africanos (FRANCO et al., 2010). Os quatro sorotipos do DENV já foram isolados nesse continente, sendo o tipo 2 (DENV-2) responsável pela maioria das epidemias. Entre janeiro de 2006 e agosto de 2008, casos de dengue foram notificados em Costa do Marfim, Burkina Faso, Benin, Senegal e Mali, países situados na parte ocidental do continente africano e cuja etiologia estava ligada ao DENV-1, 2 e 3 (AMARASINGHE et al., 2011; FRANCO et al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009c; WERE, 2012).

Essa enfermidade, conjuntamente com o seu principal vetor, *A. aegypti*, encontram-se presente na maioria dos países do continente africano e com uma rápida expansão dos diferentes sorotipos virais (Figura 4) (AMARASINGHE et al., 2011; FRANCO et al., 2010; WERE, 2012).

Nos últimos anos têm-se registrado uma grande disseminação do sorotipo DENV-3 nos países da África Ocidental, com um aumento de número de casos. Este sorotipo foi primeiramente isolado em Camarões, no ano de 2006 e no ano seguinte em Senegal. Entre 2007 e 2009 foram registradas nove epidemias nessa região associadas a esse sorotipo (FRANCO et al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009c).

Em Cabo Verde a primeira epidemia de dengue ocorreu no ano de 2009 e resultou em mais de 21.000 casos notificados, dos quais 174 foram diagnosticados como dengue



hemorrágica e ocorreram 4 óbitos, segundo dados do Ministério da Saúde de Cabo Verde (CABO VERDE, 2010; FRANCO et al., 2010). A Ilha de Santiago, a mais povoada do arquipélago, também foi a mais afetada, somando mais de 70% dos casos diagnosticados, seguida das vizinhas Ilhas do Fogo e do Maio. Testes laboratoriais de amostras procedentes de Cabo Verde foram realizados pelo Instituto Pasteur em Dakar (Senegal), confirmando o envolvimento do sorotipo DENV-3 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009b). A epidemia foi controlada e no ano seguinte foram diagnosticados poucos casos da doença, revelando, entretanto, a permanência do ciclo de transmissão nas áreas atingidas (CABO VERDE, 2010, 2011; FRANCO et al., 2010).

**Figura 4-**Presença de *Aedes aegypti* e da dengue nos países africanos



**Fonte:** Were (2012)

**Legenda:** A cor vermelha escura representa países onde ocorre a dengue e há presença do vetor, *A. aegypti*. A cor vermelha mais clara representa países onde apenas foi registrada a presença do vetor. A cor branca representa os países que não dispõem de informações relativas ao vetor e à doença.

No mesmo período da epidemia em Cabo Verde foi detectado o DENV-3 em Senegal e foi identificado um grande número de casos entre os viajantes que saíam da África Ocidental com destino aos países Europeus (FRANCO et al., 2010; WERE, 2012). O DENV-3, responsável pela epidemia em Cabo Verde, pode ter sido introduzido a partir de outros

países da África Ocidental com os quais são mantidas estreitas trocas comerciais e deslocamento de pessoas.

## 2.5 Controle vetorial

O controle de doenças de alta complexidade como a dengue, para a qual não existem vacinas disponíveis, requer um conjunto de medidas, entre elas o controle das populações de vetores, com o intuito de diminuir o número de casos dessa enfermidade. Nesse sentido, os programas de controle vetorial desempenham um papel estratégico para atingir esse objetivo (KYLE; HARRIS, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

O controle de *A. aegypti* tem se baseado na redução de criadouros, com a eliminação de recipientes que possam ser utilizados para a oviposição e o desenvolvimento das formas jovens do mosquito. Na maioria das vezes, esse processo é acompanhado pelo uso de inseticidas, sobretudo nos criadouros que não podem ser eliminados do ambiente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Outras ferramentas aplicadas ao controle vetorial foram desenvolvidas mais recentemente, como por exemplo, o uso de ovitrampas letais, repelentes espaciais, mosquitos geneticamente modificados e uso o de *Aedes* infectados com *Wolbachia* (ENDERSBY; HOFFMANN, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012; ZEICHNER; DEBBOUN, 2011).

Em Cabo Verde até o ano de 2009 o controle vetorial estava voltado para a espécie *Anopheles arabiensis*, implicada na transmissão local do *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária; mas, pela ocasião da epidemia de dengue, medidas foram direcionadas para o controle de *A. aegypti*, tais como o uso de inseticidas químicos de ação adulticida (deltametrina) intra e extra domiciliar, e de ação larvicida (*temephos*), nos criadouros com larvas e pupas do mosquito, com o objetivo de diminuir a densidade desse vetor (CABO VERDE, 2012a). Essas mesmas medidas foram retomadas nos anos seguintes, sendo desta vez apenas com o uso dos inseticidas no ambiente intra-domiciliar, em uma periodicidade de mais ou menos quatro vezes ao ano, mas sem que nenhum controle fosse feito de modo a avaliar sua eficácia.

## 2.6 Inseticidas químicos

O desenvolvimento científico dos inseticidas químicos iniciou-se em 1867, com a formulação e uso do composto arsênico “verde de Paris” e desde 1920 foi notado um

crescente aumento do potencial desses compostos como ferramenta para o controle de insetos. Em 1939, Muller descobre as propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT). Esse composto foi muito usado no controle de insetos e pragas agrícolas mas, devido a sua persistência no meio ambiente e a reduzida eficácia contra insetos resistentes, teve seu uso banido na maioria dos países (HEMINGWAY; RANSON, 2005).

Os inseticidas químicos são classificados de acordo com as suas estruturas químicas em quatro principais grupos: piretróides, organofosforados, carbamatos e organoclorados, sendo os dois primeiros os mais frequentemente usados no controle de vetores (BISSET, 2002; HEMINGWAY; RANSON, 2005).

De forma geral, esses compostos atuam ligando-se a sítios específicos nas células do inseto. Os organoclorados e os piretróides atuam no sistema nervoso, ligando-se e bloqueando o canal de sódio da membrana nervosa e nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA). Já os organofosforados e os carbamatos atuam ligando-se à enzima acetilcolinesterase (AChE) nas junções nervosas, provocando um acúmulo da acetilcolina, o que leva a uma estimulação exacerbada e morte do inseto (HEMINGWAY; RANSON, 2005).

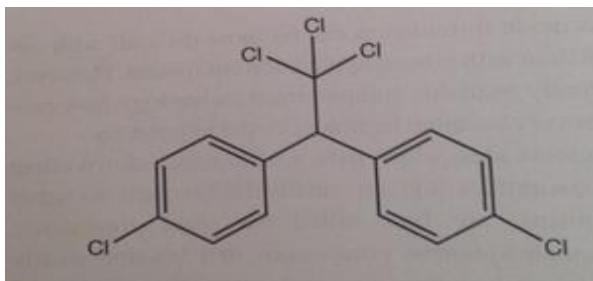
Os organoclorados são inseticidas que possuem na sua constituição as moléculas de carbono, hidrogênio e cloro. São caracterizados pela alta estabilidade química, baixa solubilidade na água e moderada solubilidade em solventes orgânicos. Estão divididos em quatro grupos: difenil-alifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos e policloroterpenos. Em vários países, inseticidas dessa classe foram proibidos devido a sua persistência no ambiente por longos períodos e pela bio-accumulação em tecidos de animais e de seres humanos (BECKER et al., 2010; BRAGA; VALLE, 2007b).

Nesse grupo, o DDT (Figura 5) é um dos compostos mais conhecidos devido a importância que teve e continua tendo no controle de vetores de doenças, principalmente no controle da malária em algumas áreas endêmicas. Esse composto tem por sítio de ação o canal de sódio e liga-se a este de forma a perturbar o balanço dos íons de sódio e potássio nos neurônios, o que leva a uma propagação exacerbada de estímulos nervosos e morte do inseto (BECKER et al., 2010).

O grupo dos organofosforados é constituído por compostos que contêm moléculas de fósforo e são derivados do ácido fosfórico. São quimicamente menos estáveis quando comparado com os organoclorados, por isso apresentam menor persistência no ambiente e constituem uma alternativa ao uso do DDT. Também, são caracterizados por serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos dos animais. Encontram-se divididos em três grupos: alifáticos (ex: *malathion*, *vapona* e *vidrin*), derivados de fenil (ex: etil e metil

*parathion* e *fenitrothion*) e os heterocíclicos (ex: *dochlorpirifos*, *clorpirifos-metil* e *temephos*) (BRAGA; VALLE, 2007b).

**Figura 5-** Estrutura molecular do organoclorado diclorodifeniltricloroetano

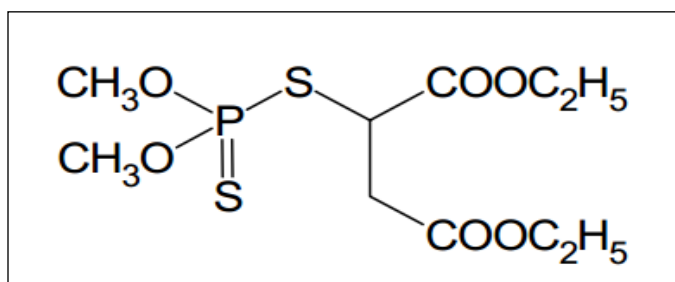


**Fonte:** Becker et al. (2010)

Os compostos desse grupo atuam inibindo de forma irreversível a ação da enzima AChE, pela sua fosforilação, não permitindo a metabolização do neurotransmissor acetilcolina em colina. A inibição dessa enzima causa a acumulação do neurotransmissor acetilcolina nas junções das terminações nervosas, o que leva a rápidos espasmos musculares, paralisção e morte do inseto (BECKER et al., 2010).

O *malathion* (Figura 6) é um organofosforado usado no controle de insetos. O seu uso foi introduzido desde 1950, principalmente para o controle de mosquitos adultos, pragas urbanas e na agricultura, apresentando uma boa eficácia. É comumente usado na forma de aerossol, na pulverização de grandes áreas, usando meios aéreos e terrestres (BECKER et al., 2003; BECKER et al., 2010). Esse composto pode ser absorvido pelo organismo via contato, ingestão ou inalação, e quando chega no fígado é metabolizado pela ação das monoxigenases de função mista (MFOs), em *malaoxon* pelo processo de sulfuração oxidativa. O metabólico *malaoxon* liga-se à enzima AChE de forma que essa não consegue metabolizar a acetilcolina nas junções dos nervos, o que leva a um acúmulo desse neurotransmissor (GERVAIS et al., 2009).

**Figura 6 -**Representação esquemática da estrutura molecular do *malathion*

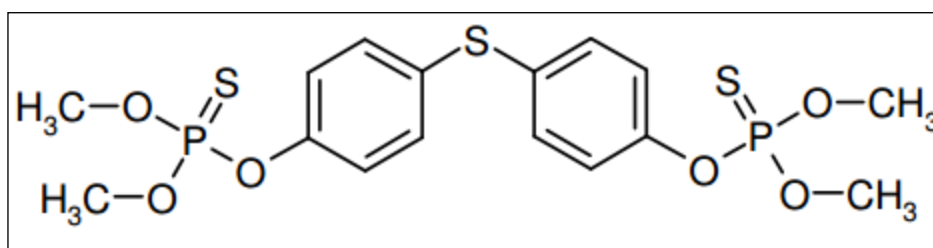


**Fonte:** Organização Mundial da Saúde (2004)

Esse composto apresenta uma toxicidade relativamente baixa para os mamíferos e as aves, devido ao fato desses possuírem maiores quantidades de enzimas esterases que degradam o *malathion* mais rápido. Nos insetos, alterações nas nessas enzimas poderão conferir resistência a esse composto (GERVAIS et al., 2009), tendo-se já registradas populações de insetos resistentes ao *malathion* (ALVAREZ et al., 2013).

Outro composto importante desse grupo é o *temephos* (Figura 7). É um dos produtos que possui um longo histórico de uso como larvicida em programas de controle de insetos. Apresenta baixa toxicidade para mamíferos, sendo o único composto recomendado para tratar água destinada ao consumo humano. É eficaz para todos os estágios larvais de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, com grande potencialidade para reduzir populações de *A. aegypti* (BECKER et al., 2010). O uso do *temephos* no controle de *A. aegypti* tem apresentando bons resultados, diminuindo e reduzindo a densidade desse mosquito em até 95% em algumas regiões (BECKER et al., 2003). No entanto, seu uso intenso tem levado ao estabelecimento de populações resistentes, o que pode comprometer o uso sustentável do inseticida (DHANG et al., 2008; LIMA et al., 2011).

**Figura 7-**Representação esquemática da estrutura molecular do *temephos*



**Fonte:** Organização Mundial da Saúde (2011b)

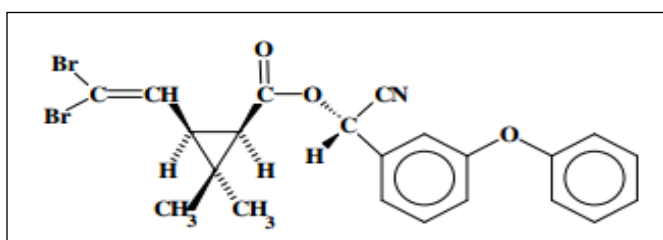
Os compostos do grupo dos carbamatos são derivados do ácido carbâmico e sua introdução para o uso como inseticida foi feita em 1951. O seu modo de ação é semelhante ao dos organofosforados. Pelo processo de carbamilação, esses compostos inibem a ação da AChE o que leva a acumulação da acetilcolina nas terminações nervosas, sendo essa inibição reversível. Esses compostos têm sido usados em controles de insetos vetores que apresentam resistência a organoclorados. O propoxur é um dos inseticidas desse grupo mais comumente usado (BECKER et al., 2010; HEMINGWAY; RANSON, 2005).

Os inseticidas do grupo dos piretróides são produzidos a partir do composto piretro, extraído de flores do *Chrysanthemum* spp. São caracterizados por serem biodegradáveis, não acumulativos e apresentarem baixa toxicidade para os mamíferos. No entanto, são tóxicos

para os peixes. São muito usados no controle de mosquitos adultos vetores, principalmente em redes impregnadas nos programas de controle da malária, ou como larvicidas (ex: permetrina na concentração de 15 mg/l). Existe um leque variado de compostos derivados do piretro, tais como a deltametrina, cipermetrina, bifentrina e lambda-cialotrina. Esses podem ser divididos em dois grupos, os de primeira geração, que são suscetíveis a degradação pela luz ultra violeta e os de segunda geração, que são fotoestáveis (BECKER et al., 2010; BRAGA; VALLE, 2007b; HEMINGWAY; RANSON, 2005).

Esses compostos atuam no sistema nervoso central e periférico dos insetos de forma semelhante ao organoclorado DDT. Ligam-se ao canal de sódio, de forma que este permaneça aberto, o que leva a uma propagação continuada de estímulos nervosos e consequente paralisação do inseto. Esse efeito é conhecido como efeito *knock-down* dos piretróides e pode culminar na morte do inseto. A deltametrina (Figura 8) e a cipermetrina (Figura 9) são dois desses compostos que têm sido muito usados no controle de vetores transmissores de enfermidades como a dengue e a malária (BECKER et al., 2010).

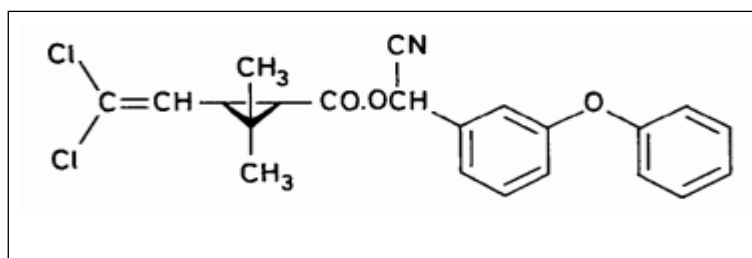
**Figura 8-**Estrutura molecular do piretróide deltametrina



**Fonte:**Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (2009)

A deltametrina (Figura 8) é usada no formato de aerossol pulverizado em superfícies e apresenta boa eficácia para o controle de populações de insetos vetores, como *A. aegypti*, em locais de epidemia, reduzindo em mais de 70% as formas adultos desse mosquito (BECKER et al., 2003).

**Figura 9-**Estrutura molecular do piretróide cipermetrina



**Fonte** Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (2000).

Uma outra classe especial de inseticidas químicos são os reguladores de crescimento de insetos (I.G.R<sup>1</sup>), também conhecidos como inseticidas de terceira geração. Os compostos pertencentes a esse grupo atuam de forma a perturbar o normal desenvolvimento dos insetos, são divididos em dois grupos tendo em conta a sua forma de ação: os análogos do hormônio juvenil, que interferem no processo da metamorfose e os inibidores de síntese de quitina, que interferem na formação da cutícula do inseto (BECKER et al., 2010; HEMINGWAY; RANSON, 2005).

Em 1917, Stephan Kopeç demonstrou que a metamorfose nos insetos é controlado por hormônios, produzidos pelo cérebro e Williams, em 1967, foi o primeiro a sugerir que os hormônios poderiam ser usados como sítios de ação no controle de insetos. Nesse processo três hormônios desempenham papéis essenciais, o hormônio *prothoracicotropic* (P.T.T.H), o hormônio *ecdysteroid* e o hormônio *juvenil* (J.H). O J.H está envolvido na regulação da passagem de uma fase do inseto à outra. Na presença de maior quantidade desse hormônio haverá um retardo ou, até mesmo, a inibição da metamorfose, enquanto que sua diminuição e faz com que o processo ocorra de forma prematura. Tendo em conta as funções que J.H desempenha nos insetos, foram desenvolvidos compostos análogos ao J.H usados no controle de insetos, como são exemplos do *metoprene*, introduzido em 1973; do *fenoxycarb*, introduzido em 1981 e do *pyriproxyfen*, introduzido em 1984. Esses compostos foram projetados para funcionarem como análogos do J.H e interferir assim no processo de metamorfose dos insetos, afetando o desenvolvimento da fase adulta (OBERLANDER; SILHACEK, 2000).

Além dos I.G.R, que atuam como análogos ou inibidores do J.H, existem os que tem por sítio-alvo a inibição da síntese da quitina. (RECHCIGL; RECHCIGL, 2000). Esses compostos interferem no processo de biossíntese da quitina, que é um polímero constituído de *N*-acetilglicosamina, fundamental na formação do exosqueleto dos invertebrados, ocasionando acidentes de muda e a não eclosão de larvas (MERZENDORFER, 2013).

Os inibidores de síntese de quitina constituem um leque variado de compostos químicos divididos nas seguintes classes: *pyrimidinenucleoside peptides*, *benzoylurea*, *oxazolines*, *thiazolidines*, *tetrazines*, *thiadiazines*, *thiophthalimides*, *certainchromo* e *Chromo fluorophores*. Os *benzoylurea* atuam bloqueando uma das etapas da pós-catálise da síntese de quitina. Os compostos, *diflubenzuron*, *triflumuron*, *teflubenzuron*, *hexaflumuron*,

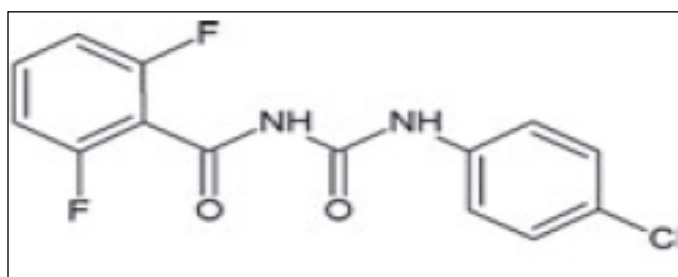
---

<sup>1</sup> Sigla do inglês *Insect Growth Regulator*

*flufenoxuron*, *lufenuron* e *novaluron* pertencem a esse grupo e causam perturbações na formação da cutícula do inseto e na eclosão das larvas.

O *diflubenzuron* (1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) (Figura 10) foi introduzido como inseticida a partir de 1970, sendo o primeiro composto desse grupo que demonstrou ser eficaz para o controle de insetos. Ele não tem efeito para as formas adultas dos insetos, mas é bastante eficaz nas formas jovens (larvas e pupas). Atua inibindo a ação da enzima quitina sintetase na última fase da síntese da quitina, levando a uma não polimerização da *N*-acetilglicosamina e consequente má formação da cutícula do inseto. Sua ação poderá constituir boa ferramenta para o controle de populações de vetores que apresentam resistência a outros compostos usados no controle das fases jovens dos insetos (BECKER et al., 2010; BISSET, 2002).

**Figura 10**-Estrutura molecular do diflubenzuron



**Fonte:** Merzendorfer (2013)

## 2.7 Inseticidas biológicos usados no controle de mosquitos

Além dos inseticidas químicos, o controle de vetores poderá ser realizado usando agentes biológicos como: predadores, parasitas, competidores ou toxinas microbianas. Esses agentes apresentam pouco ou nenhum dano ao meio ambiente. Os primeiros registros do uso de agentes biológicos para o controle de insetos datam de 2700 a.C, na China. No entanto, apenas em 1919 o termo controle biológico começou a ser usado, sendo definido como a supressão de populações de insetos usando inimigos naturais destes (BECKER et al., 2010; RECHCIGL; RECHCIGL, 2000).

No controle biológico poderá ser usado predadores como as espécies de peixes larvicidas *Gambusia affinis* e *Poecilia reticulata* ou até mesmo larvas de mosquitos do gênero *Toxorhynchites* spp. que se alimentam de outras larvas de mosquitos. Existem ainda parasitas pertencentes aos gêneros *Heterorhalditis* spp. e *Steinernema* spp. que também podem ser



usadas para controle de mosquitos. Os fungos do gênero *Coelomomyces* spp. e *Lagenidium* spp. também são usados como agentes nesse controle (BECKER et al., 2010).

Além dos exemplos acima citados, existem ainda agentes bacterianos usados nesse controle, sendo a maioria pertencente às famílias de Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae e Micrococaceae. Os gêneros *Bacillus* (Bacillaceae) e *Serratia* (Enterobacteriaceae) são os mais usados. Toxinas de determinadas espécies de bactérias possuem propriedades inseticidas, como são os casos de *Bacillus sphaericus* (Bs) e *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (Bti). A primeira é usada no controle de larvas de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*, no entanto para a espécie *A. aegypti* ela é completamente refratária (BECKER et al., 2010). O Bs foi descrito pela primeira vez em 1965 sendo muito eficaz no controle de espécies de mosquitos *Culex* spp. (RECHCIGL; RECHCIGL, 2000).

O gênero bacteriano *Bacillus* é o mais importante agente usado no controle de insetos. São bactérias Gram positivas, produtoras de esporos, que durante o processo de esporulação formam um cristal tóxico para importantes insetos vetores. Esses cristais quando se ligam às superfícies das microvilosidades do intestino do inseto causam perturbações no equilíbrio osmótico, culminando na sua morte (RECHCIGL; RECHCIGL, 2000).

O Bti, isolado em 1976, é uma bactéria Gram positiva, esporulante, produtora de um cristal com propriedades inseticidas, constituído pelas proteínas Cry e Cyt. Esse cristal é tóxico para as larvas de algumas espécies de invertebrados pertencentes a ordem Diptera dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*. Quando o cristal é ingerido pelas larvas, as toxinas são liberadas no ambiente alcalino do intestino pela ação de enzimas proteolíticas, sendo que as proteínas Cry ligam-se a receptores nas células das microvilosidades do intestino, enquanto que as Cyt ligam-se diretamente à membrana lipídica, formando poros ou destruindo-as. O Bti tem sido usado como alternativa aos compostos químicos sintéticos, atua na fase larval e se mantém na superfície da água (BRAVO; GILL; SOBERON, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009a).

## **2.8 Resistência a inseticidas químicos em *Aedes aegypti***

Não obstante os resultados alcançados com o uso dos inseticidas químicos, a sua eficiência tem sido questionada devido ao surgimento de populações de insetos vetores resistentes a eles. O estabelecimento e a disseminação da resistência tem se tornado um dos maiores desafios para os programas de controle vetorial da dengue e de outras doenças

transmitidas por vetores (BROGDON; MCALLISTER, 1998a; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012; RANSON et al., 2010). A resistência é definida como sendo a capacidade de um organismo em tolerar doses de uma substância tóxica que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população da mesma espécie (HEMINGWAY; RANSON, 2005). A seleção da resistência é dependente de diversos fatores, entre eles a quantidade e a frequência da aplicação dos inseticidas, ou seja, a pressão da seleção e as características populacionais bioecológicas típicas da espécie-alvo envolvida (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

Para a espécie de mosquito *A. aegypti* existem registros de populações resistentes a determinadas classes de inseticidas, principalmente aos organofosforados e aos piretróides (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; KARUNARATNE; HEMINGWAY, 2001; LLINAS et al., 2010; MARCOMBE et al., 2011; MARCOMBE et al., 2012; PONLAWAT; SCOTT; HARRINGTON, 2005). Em uma análise realizada em 13 amostras de populações de campo de *A. aegypti* da África, América Latina e Ásia, detectou-se que 11 (85%) delas eram resistentes ao piretróide permetrina, demonstrando a disseminação do fenômeno de resistência no mundo (BRENGUES et al., 2003).

No continente africano, um estudo realizado com *A. aegypti* proveniente da região da África Ocidental (Burkina, Faso e Nigéria), no ano de 1967, demonstrou que aquelas populações eram suscetíveis ao DDT, mas com a possibilidade do desenvolvimento de resistência, o que acabaria por acontecer anos depois (INWANG; KHAN; BROWN, 1967; MOUCHET et al., 1971). Estudos mais recentes com populações de *A. aegypti* de outros países da África Ocidental (Costa do Marfim e Senegal) revelaram resistência aos inseticidas propoxur, deltamethrin, lambda-cyhalothrina e ao DDT (DIA et al., 2012; KONAN et al., 2012). No arquipélago de Cabo Verde, estudos realizados com populações de *A. aegypti* (ilha de Santiago), coletadas no final de 2009, detectaram resistência ao DDT e suscetibilidade ao organofosforado fenitrothion e aos piretróides deltametrina, lambda-cyhalothrina e permetrina. Para o inseticida propoxur foi detectado um *status* de verificação da resistência (DIA et al., 2012).

Em algumas regiões, o estabelecimento da resistência aos piretróides e ao *temephos* em populações de campo de *A. aegypti* tem levado ao comprometimento dos programas de controle vetorial (RANSON et al., 2010). Uma razão de resistência acima de 10 vezes, segundo Montella et al. (2007), representa a possibilidade de comprometimento da efetividade do controle do mosquito em campo. Os mesmos autores apontam para a importância de se detectar a resistência em uma fase incipiente, antes que esta se dissemine na população de

campo. Pode-se usar como exemplo os estudos realizados na Martinica, nos quais são demonstradas evidências de que a resistência aos piretróides em populações de *A. aegypti* reduz a efetividade dos produtos usados para o controle das populações desse mosquito (MARCOMBE et al., 2011).

## 2.9 Mecanismos de resistência a inseticidas

A resistência é uma característica herdada geneticamente e não é selecionada uniformemente em todas as espécies ou populações de uma mesma espécie. Existem pelo menos três principais mecanismos que podem estar envolvidos na resistência, a saber: a redução na penetração do inseticida, a insensibilidade de sítios-alvo e pela ação de enzimas detoxificadoras (BISSET et al., 2001; BRAGA; VALLE, 2007b; HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). Existe ainda a resistência resultante apenas da mudança comportamental, quando o inseto evita o contato com a superfície tratada com inseticida (HEMINGWAY; RANSON, 2005).

O mecanismo de resistência ligado a redução na penetração do inseticida caracteriza-se pelo espessamento ou pela mudança na composição química da cutícula do inseto. Confere pouca resistência, mas é importante quando associado com outros mecanismos, como é o caso do metabólico (KARUNARATNE, 1998).

A ação das enzimas de detoxificação é considerada um dos principais mecanismos que confere resistência aos inseticidas. Caracterizando-se pelo aumento da capacidade do inseto em metabolizar os compostos devido às alterações estruturais daquelas já existentes, tornando-as mais eficientes; ou ainda pelo aumento da quantidade delas. Os monoxigenases, as esterases e as glutathione S-transferases são os principais grupos de enzimas que podem estar envolvidas nesse processo (BRAGA; VALLE, 2007b; BROGDON; MCALLISTER, 1998a).

As esterases (também designadas de carboxilesterases) é uma família de enzimas que catalisam a reação de hidrólise dos ésteres carboxílicos via adição de uma molécula de água. Atuam ligadas ao inseticida, evitando que este atinja seu sítio de ação, ou pelo processo de sequestro desses compostos. Estão envolvidas na hidrólise dos piretróides, carbamatos, organofosforados e de outros xenobióticos (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; ROUSH, 1993; WHEELOCK; SHAN; OTTEA, 2005).

A atividade das  $\alpha$ -esterases,  $\beta$ -esterases e PNPA pode ser medida pela capacidade que essas enzimas têm de hidrolisar os substratos  $\alpha$ -*naphthyl* acetate,  $\beta$ -*naphthyl* acetate e *P*-

*nitrophenil* acetate respectivamente, sendo essa a forma usada para a classificação das esterases nos mosquitos (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; MONTELLA et al., 2007; WHEELOCK; SHAN; OTTEA, 2005). Existem três mecanismos moleculares através dos quais as esterases conferem resistência aos inseticidas, quais sejam: pela amplificação gênica, pela expressão de esterases mutantes com maior capacidade de metabolização e pela presença de mutação no gene regulador, resultando numa super-expressão das enzimas (BROGDON; MCALLISTER, 1998a; WHEELOCK; SHAN; OTTEA, 2005).

As monoxigenases (também designadas de monoxigenases de função mista – MFOs) atuam ligando-se a uma molécula de oxigênio e recebem um elétron da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para introduzir um átomo de oxigênio no substrato, resultando na formação de uma molécula de água. Os citocromos P450 são hemoproteínas que atuam como terminais oxidantes no sistema monoxigenase (BERGE; FEYEREISEN; AMICHOT, 1998; SCOTT, 1999). A resistência conferida pelas monoxigenases ocorre frequentemente pelo aumento da atividade de detoxificação, em decorrência da super-expressão dessas enzimas. Também poderá ocorrer pela diminuição da bioativação no caso de alguns organofosforados, bem como por mutações no sítio-ativo da enzima, levando a uma maior capacidade de detoxificação (BERGE; FEYEREISEN; AMICHOT, 1998; SCOTT, 1999). Têm-se demonstrado o envolvimento destas enzimas como um importante mecanismo de resistência a piretróides no mosquito *A. aegypti* na América Latina e no sul da Ásia. Por exemplo, o aumento da atividade das MFOs está fortemente associado à resistência a piretróides em *A. aegypti* de Cuba e Grand Cayman (BARIAMI et al., 2012).

A família das enzimas GSTs é constituída por seis classes (Delta, Epsilon, Zeta, Omega, Theta e Sigma) encontradas nos mosquitos. Na classe Epsilon está presente a maioria das enzimas que conferem resistência aos inseticidas. Essas são apontadas como estando envolvidas na resistência ao DDT e a diversos piretróides (BROGDON; MCALLISTER, 1998a; LUMJUAN et al., 2005; LUMJUAN et al., 2007). São vários os registros de populações de *A. aegypti* nos quais os mecanismos de resistência metabólica estão presentes, por exemplo, na população Grand Cayman resistentes a DDT, piretróides e ao lambda-cyhalotrin foi encontrado um elevado nível de atividade das esterases, MFOs e GSTs (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010). Populações brasileiras resistentes ao *temephos* e cipermetrina apresentaram alterações nas atividades das enzimas GSTs e  $\alpha$ -esterase (LIMA et al., 2011; MONTELLA et al., 2007).

O segundo mecanismo mais importante que confere resistência a inseticidas é a insensibilidade ao sítio alvo, ou seja, quando o inseticida não consegue se ligar ao seu sítio de

ação devido as alterações presentes em aminoácidos responsáveis por estabelecer tais ligações (BROGDON; MCALLISTER, 1998a; ROUSH, 1993). Inseticidas do grupo dos organofosforados e carbamatos têm como sítio-alvo a AChE, responsável pelo metabolismo do neurotransmissor acetilcolina em colina. A presença de alterações (mutações) na AChE causa a insensibilidade a esses compostos, não produzindo o efeito desejado (BROGDON; MCALLISTER, 1998a; HEMINGWAY; RANSON, 2000). Outro sítio de ação dos inseticidas, principalmente do grupo dos piretróides e de alguns organoclorados, é o canal de sódio. Os inseticidas atuam nesse canal de forma a mantê-lo aberto levando a uma propagação continuada de estímulos nervosos que podem causar a morte do inseto (BRAGA; VALLE, 2007b; HEMINGWAY; RANSON, 2000).

O canal de sódio é uma proteína complexa da membrana celular, responsável por gerar um potencial de ação na membrana dos neurônios, conduzindo informações elétricas no sistema nervoso (CATTERALL, 2000). O canal de sódio apresenta uma subunidade  $\alpha$  constituída por quatro domínios homólogos internos (I–IV) e cada um está dividido em seis segmentos  $\alpha$ -hélice transmembranar (S1–S6) (KARATOLOS et al., 2012; VAIS et al., 2001). Várias mutações podem ocorrer na subunidade  $\alpha$  levando resistência aos inseticidas, principalmente àqueles do grupo dos piretróides. Na figura 11 estão destacados pontos de mutações que podem conferir resistência a esses compostos (SODERLUND, 2008).

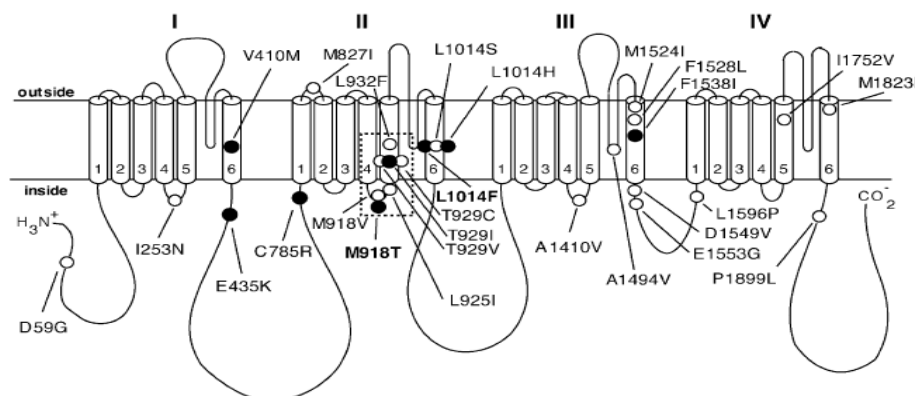
As mutações levam a uma redução da afinidade entre o inseticida e o sítio-alvo e consequentemente impedem que haja o efeito *knock-down* causado pelos piretróides, DDT e análogos do DDT (SODERLUND, 2008). Essa resistência, *knock-down resistance (kdr)*, está dividida em tipo *kdr* e super *kdr*, de acordo com a intensidade do efeito da mutação. Esse mecanismo já foi observado em *A. aegypti* e em outras espécies de insetos (KARUNARATNE, 1998; SODERLUND, 2008).

A substituição de uma leucina por uma fenilalanina no domínio IIS6, designado de L1014F, está associada a uma resistência moderada; e a substituição de uma metionina por uma tirosina, designada M918T, no domínio II na ligação entre o S4 e S5, está ligada ao fenótipo *super-kdr* (VAIS et al., 2001). A mutação L1014F tem sido encontrada em várias espécies de artrópodes, enquanto que a mutação M918T não é muito frequente. Além destas duas mutações, várias têm sido encontradas na subunidade  $\alpha$  do canal de sódio de insetos (SODERLUND; KNIPPLE, 2003).

De forma geral, as mutações no canal de sódio ocorrem em três locais, a maioria nos segmentos transmembranares S5 e S6, nos domínios I, II e III, numa pequena região intracelular que conecta os segmentos S4 e S5 e também no início e no fim das ligações

intracelulares que separam os domínios homólogos (SODERLUND; KNIPPLE, 2003). A região onde ocorre a maioria das mutações kdr é conservada, e as mutações são conservadas em diferentes espécies, demonstrando sua importância na resistência aos piretróides (MARTINEZ-TORRES; A. L. DECONSHIRE; WILLIAMSON, 1997; VAIS et al., 2001).

**Figura 11**-Representação esquemática da proteína do canal de sódio e pontos de mutação



**Fonte:** Soderlund (2008)

**Legenda:** (I – IV) Os quatro domínios homólogos internos e respectivos segmentos  $\alpha$ -hélice transmembranar (S1 – S6)

Em outras espécies de mosquitos vetores também já foram descritas a presença de mutações no canal de sódio associadas à resistência, como por exemplo em populações de *Culex pipiens* e *Anopheles gambiae s.s* da África Ocidental (MARTINEZ-TORRES et al., 1999; MARTINEZ-TORRES et al., 1998). Estudos realizados com populações de *A. aegypti* têm detectado várias mutações no canal de sódio associadas à resistência a piretróides. As mutações V1016I, L982T, V1016L e F1552C são alguns exemplos encontrados em populações de diferentes regiões (MARTINS et al., 2009a; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007; YANOLA et al., 2010).

A presença desse mecanismo de resistência em populações de campo pode acarretar consequências negativas para o uso sustentável dos inseticidas no controle dos insetos. Por essa razão, a detecção e caracterização precoce desse e dos outros marcadores de resistência são fundamentais para o desenvolvimento de uma estratégia de manejo (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007; SODERLUND; KNIPPLE, 2003).

### **3 PERGUNTA CONDUTORA**

Qual o perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, aos inseticidas químicos e biológicos já utilizados ou com potencial de uso para seu controle?

#### **3.1 Hipótese**

A população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, é suscetível aos inseticidas com potencial de uso ou já utilizados para seu controle, dado o curto período de exposição a esses compostos em campo.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Caracterizar o perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* da Ilha de Santiago, Cabo Verde, a inseticidas químicos e biológicos, bem como avaliar marcadores bioquímicos e moleculares associados à resistência.

### 4.2 Específicos

- a) Determinar a susceptibilidade aos inseticidas com ação larvicida e/ou pupicida (*temephos*, diflubenzuron e *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis*) e a adulticidas (cipermetrina, deltametrina e *malathion*);
- b) Avaliar a atividade das enzimas glutathione S-transferases, esterases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e PNPA) e oxidases de função mista, ligadas à resistência metabólica e da acetilcolinesterase, ligada à resistência do tipo sítio-alvo;
- c) Avaliar a ocorrência de mutações associadas à resistência do tipo *kdr* no gene do canal de sódio, alvo da ação dos piretróides.



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

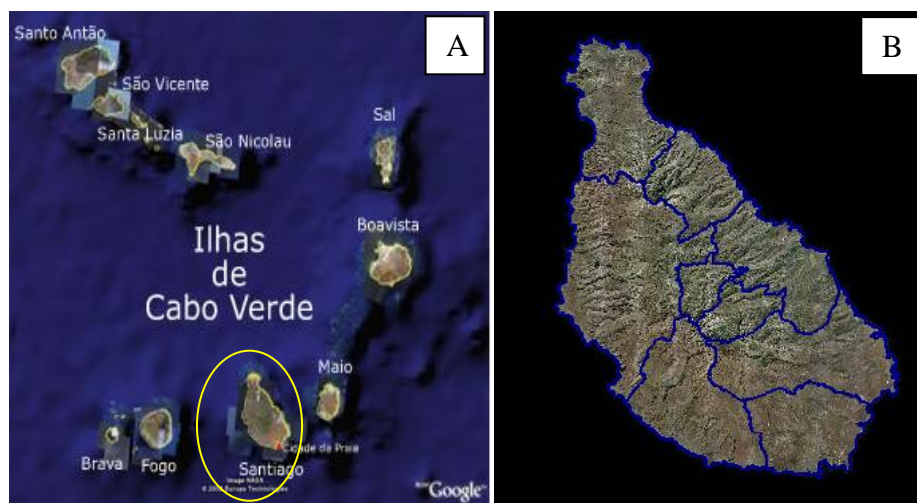
### 5.1 Desenho do estudo

O estudo enquadra-se como sendo do tipo experimental, descritivo e transversal, para avaliar o perfil de suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a inseticidas.

### 5.2 Área e período do estudo

As amostras de *A. aegypti* foram obtidas no perímetro urbano dos nove municípios que compõem a ilha de Santiago (Lat: 15°06'14.21" Lon: 23°38'33.28"), localizada no arquipélago de Cabo Verde, na Costa Ocidental Africana (Figura 12). As coletas foram realizadas no período de março a maio de 2012.

**Figura 12**-Mapa do arquipélago de Cabo Verde e da ilha de Santiago



**Fonte:** Google earth 2013 e Cabo Verde (2013)

**Legenda:** **A** – Imagem de satélite das ilhas do arquipélago de Cabo Verde, com destaque para a ilha de Santiago, no sul do país. **B** - Mapa da ilha de Santiago com as divisões entre os nove municípios.

### 5.3 População e colônias de *Aedes aegypti*

#### 5.3.1 Colônia Rockefeller do mosquito *A. aegypti*

*A. aegypti* da colônia Rockefeller, referência de suscetibilidade a inseticidas químicos, foram obtidos de colônias mantidas nas instalações do insetário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (CPqAM-FIOCRUZ) e provenientes do laboratório do CDC, EUA estabelecidos desde 1930.

### 5.3.2 População da colônia Rec-Lab

*A. aegypti* da colônia Rec-Lab, referência de suscetibilidade ao larvicida Bti, foram obtidos a partir de amostras de ovos recolhidas na Zona Metropolitana do Recife. A colônia é mantida nas instalações do insetário do CPqAM-FIOCRUZ desde 1996.

### 5.3.3 População de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago

As amostras, provenientes dos diferentes municípios da ilha de Santiago, foram obtidas através da coleta de ovos por armadilhas de oviposição (ovitrapas), adaptadas do modelo Fay; Perry (1965). As ovitrapas (OVT) consistem em um recipiente de plástico de cor preta, com capacidade para 1 litro de água, contendo 1 palheta de “eucatex” (5 cm x 15 cm) presa à borda do vaso com um “clips” (Figura 13). As armadilhas foram instaladas em áreas peri-domiciliares de imóveis previamente selecionados, em locais ao abrigo do sol e da chuva, a cerca de um metro do chão, por um período de sete dias. A quantidade de armadilhas colocadas foi de 40 a 50 unidades em cada município (Praia, Ribeira Grande, Santa Cruz, São Domingos, Tarrafal, Santa Catarina, São Miguel, São Salvador do Mundo e São Lourenço dos Órgãos).

**Figura 13**-Ovitrapa, adaptada do modelo de FAY; PERRY (1965) usada para a coleta de amostras de ovos de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde.



**Fonte:** Rocha (2013a)

#### 5.4 Estabelecimento da população de *Aedes aegypti* em laboratório

As palhetas que serviram como substratos para a deposição dos ovos pelas fêmeas de *A. aegypti* foram acondicionados e encaminhadas para o Departamento de Entomologia do CPqAM- FIOCRUZ, Recife, Brasil, onde foram mantidas temporariamente para a realização do estudo. No insetário, as palhetas foram submersas em água, sem cloro, com infusão de gramínea a 30%, para promover a eclosão rápida e sincrônica das larvas. Após uma hora, as larvas recém-eclodidas (L<sub>1</sub>) foram transferidas para cubas, preenchidas com cerca de 1L de água e ração para gatos macerada e autoclavada (Figura 14). Em cada cuba foram colocadas aproximadamente 300 larvas, que foram mantidas sob condições controladas de temperatura ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar (58% a 86%) e fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro.

**Figura 14**-Cuba com larvas de *Aedes* spp. da ilha de Santiago, mantidas em insetário em cubas com água desclorada e ração de gato para alimentação



**Fonte:** Rocha (2013b)

Na fase de pupa, os indivíduos, foram separados pelo sexo, usando como critério o tamanho. Após a emergência, os adultos foram transferidos para gaiolas de contenção (Figura 15) e foi realizada a triagem da espécie alvo (*A. aegypti*) utilizando a chave de identificação proposta por Huang (2004). Após a triagem, os machos e as fêmeas de *A. aegypti* foram transferidos para uma mesma gaiola.

O estabelecimento da geração parental e das gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> foi realizado com um quantitativo de 1.000 indivíduos com uma razão de sexo de 1:1. Aos machos e fêmeas foi oferecida diariamente solução de sacarose a 10%, e adicionalmente para as fêmeas, um repasto sanguíneo em galinha, duas vezes por semana, para obtenção das gerações filiais.

**Figura 15**-Gaiolas de contenção com *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde



Fonte: Rocha (2013c)

Os ovos foram depositados em pequenas palhetas (5 cm X 3 cm) umedecidas com infusão de gramínea a 30%, para estimular a oviposição (Figura 16). Após a embriogênese os ovos foram parcialmente desidratados à temperatura ambiente e armazenados até a sua utilização.

**Figura 16**-Palheta umedecida com infusão de gramínea e com ovos de *Aedes aegypti*



Fonte: Rocha (2013d)

### 5.5 Bioensaios - inseticidas com atividade para formas jovens do mosquito

Os bioensaios foram realizados na modalidade dose resposta (DR), expondo larvas da geração  $F_2$  e  $F_3$  à múltiplas concentrações crescentes dos seguintes compostos: *temephos* em grau técnico, com a concentração de princípio ativo (P.A) de 97,5% do lote SZE9105X Sigma; biolarvicida *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (Bti) IPS 82 do Instituto Pasteur; inibidor de síntese de quitina *diflubenzuron* em grau técnico, P.A de 99,5%, lote: 5ZE7800X, Sigma. O primeiro inseticida é usado com larvicida no programa de controle de *A. aegypti* em Cabo Verde, enquanto que os dois últimos ainda não tiveram seus usos introduzidos.

As concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) para o *temephos* e Bti foram estimadas por regressão linear Log-Probit (FINNEY, 1971), usando o programa estatístico SPSS 8.0/Windows. Procedeu-se da mesma forma para estimar as concentrações de inibição de emergência (IE<sub>50</sub> e IE<sub>90</sub>) para o *diflubenzuron*.

Para calcular a Razão de Resistência (RR<sub>50</sub> e RR<sub>90</sub>) ao *temephos* e Bti da população de campo usou-se como referência as CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> da colônia Rockefeller e Rec-Lab respectivamente, usando a fórmula apresentada abaixo. Do mesmo modo, foram calculadas as RR<sub>50</sub> e RR<sub>90</sub> para o *diflubenzuron*, tendo como referência a IE<sub>50</sub> e a IE<sub>90</sub> para a colônia Rockefeller.

$$RR_{50/90} = \frac{CL_{50/90} \text{ da pop. de campo}}{CL_{50/90} \text{ de Rockefeller/Rec-Lab}}$$

A classificação para o *temephos* e para o Bti seguiu os seguintes critérios: suscetível RR < 3; Resistência baixa 3 ≤ RR ≤ 5; Resistência moderada 5 < RR ≤ 10; Resistência alta RR > 10 (MAZZARRI; GEORGHIOU, 1995). Para o *diflubenzuron* não se estabeleceu um critério de classificação, ficando as análises restritas à comparação com a colônia Rockefeller, referência de suscetibilidade a inseticidas químicos.

#### 5.5.1 Bioensaio usando o *temephos* e *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis*

Para testar os dois compostos foram usados grupos homogêneos de 20 larvas no estágio L<sub>3</sub> por teste, colocadas em copos plásticos descartáveis com 100 ml de água mineral (*temephos*) ou destilada (Bti) contendo múltiplas concentrações de *temephos* (0,014 a 0,050 mg/l) ou Bti (0,004 a 0,05 mg/l), com o intuito de promover mortalidades entre 10% e 100%. Cada concentração foi testada em triplicata, além de grupos controles não tratados. Três bioensaios para cada composto foram realizados em datas diferentes para a definição da resposta da população de campo. As leituras dos testes foram feitas após 24 horas da aplicação dos larvicidas. As larvas que não apresentavam movimento ou com limitação de movimentos foram consideradas mortas (BRAGA et al., 2004; DE BARJAC; LARGET-THIÉRY, 1984. ; MONTELLA et al., 2007; ORGANIZAÇÃO-MUNDIAL-DE-SAÚDE, 1984).

### 5.5.2 Bioensaio usando o *diflubenzuron*

Foram preparadas concentrações do inseticida que promoveram a mortalidade entre 10% a 100% (0,4 µg/l a 3,5 µg/l). Grupos de 10 larvas L<sub>3</sub> e/ou L<sub>4</sub> jovens foram colocados em copos descartáveis contendo as concentrações do inseticida em 100 ml de água mineral. Para cada concentração foram testadas oito réplicas. Três testes em datas diferentes foram realizados. Os bioensaios foram concluídos quando todas as formas aquáticas dos mosquitos morreram ou com a emergência dos adultos no máximo de 30 dias. Adultos que apresentaram acidente de muda foram consideradas como mortas (FONTOURA et al., 2012; MARTINS et al., 2008).

## 5.6 Testes de suscetibilidade de adultos

Os bioensaios para avaliar a suscetibilidade aos adicticidas foram realizados na modalidade dose diagnóstica (DD) em testes de garrafas impregnadas com doses únicas dos piretróides deltametrina (P.A 98% lote:S1E8297X Sigma), cipermetrina (P.A 99,7% lote:127K1099 Sigma) e ao organofosforado *malathion* (P.A 97,2%, lote: SZB9146XV, Sigma). Em cada garrafa foram colocadas entre 15 a 25 fêmeas de mosquitos, com dois dias de idade, alimentadas com sacarose (10%) e sem alimentação sanguínea. Cada teste foi realizado em triplicata e repetido em três datas diferentes. Para os piretróides, foi avaliado o efeito *knock down* de 15 em 15 minutos até o máximo de 120 minutos nas garrafas contendo os inseticidas. Posteriormente, os mosquitos foram transferidos para gaiolas sem inseticidas e realizou-se a leitura da mortalidade após 24 horas, usada como critério para a caracterizar a população. Para o *malathion* a mortalidade foi avaliada de 15 em 15 minutos até o máximo de 120 minutos (BROGDON, 1989; BROGDON; MCALLISTER, 1998b).

A classificação do *status* de suscetibilidade da população de *A. aegypti* foi realizada segundo os seguintes critérios: Suscetível mortalidade  $\geq 98\%$ ; Resistente mortalidade  $<80\%$ ; e com alteração de suscetibilidade mortalidade  $< 98\%$  a  $\geq 80\%$  (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1981 ).

Em cada bioensaio para os piretróides cipermetrina e deltametrina foram preparadas três garrafas impregnadas com dose letal para 100% de fêmeas da colônia Rockefeller após 30 minutos de exposição (8 µg/µl e 3 µg/µl respectivamente), e uma garrafa controle com o diluente acetona (PA ACS 99,5% Proquimios) usada com controle negativo (Figura 17) (BROGDON, 1989; BROGDON; MCALLISTER, 1998b). O piretróide deltametrina é usado

com adulticida no programa de controle de *A. aegypti* em Cabo Verde (CABO VERDE, 2012a).

Nos bioensaios para o *malathion* preparou-se três garrafas impregnadas com a dose letal para 100% de fêmeas da colônia Rockefeller após 45 minutos (30 µg/µl) e uma garrafa controle contendo 1 ml de acetone (P.A 99,5% Sigma-Aldrich), usada com controle. (BROGDON, 1989; BROGDON; MCALLISTER, 1998b).

**Figura 17**-Garrafas impregnadas com dose diagnóstica de adulticida



Fonte: Rocha (2013e)

## 5.7 Testes bioquímicos

Como parte da caracterização dos mecanismos da resistência aos inseticidas foi feita a quantificação da atividade das seguintes enzimas: glutathione S-transferases (GSTs), esterases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e PNPA) e as oxidases de função mista (MFOs), ligadas a detoxificação de xenobióticos. Também foi avaliada a enzima acetilcolinesterase (AChE) que é o sítio-alvo de organofosforados, para avaliar o mecanismo de resistência associada a alteração ou insensibilidade desta molécula.

Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo descrito em BRASIL (2006), utilizando aproximadamente 100 fêmeas adultas com um dia de idade e sem alimentação, armazenadas a -70° C. Essas foram maceradas, centrifugadas a 313 x g por 6 minutos a 4 °C e incubadas com substratos específicos (Quadro 1) para cada enzima, em microplacas de 96 poços.

Todos os testes foram realizados com amostras em duplicata e repetidos pelo menos três vezes em datas diferentes. A atividade enzimática específica obtida para cada indivíduo foi obtida a partir da concentração de proteínas totais, mensuradas através do método de BRADFORD (1976). Os perfis enzimáticos da população de campo foram analisados por

comparação com o percentil 99 da atividade enzimática de mosquitos da colônia Rockefeller, usando o *software GEN5* (BRASIL, 2006). A população foi classificada de acordo com o percentual de indivíduos que apresentaram atividade acima do percentil 99 da Rockefeller como: sem alteração < 15%; alterada  $\geq 15\%$  e  $\leq 50\%$  e muito alterada > 50% (MONTELLA et al., 2007).

**Quadro 1-** Substratos específicos usados na caracterização do perfil enzimático das esterases, glutatona S-transferases, oxidases de função mista e acetilcolinesterase em *Aedes aegypti*.

Enzimas	Substratos específicos	Comprimento da onda (nm)
<b>Acetilcolinesterase (AChE)</b>	Iodeto de acetiltiocolina (Sigma)	405
<b>Glutathione S-transferase (GSTs)</b>	Glutathione reduzida/ 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (Sigma/Sigma)	340
<b>Oxidases de Função Mista (MFOs)</b>	3,3,5,5 dihidroclorato de tetrametil benzidina (Sigma)	650
<b>Esterases alfa, beta</b>	alfa-naftil acetato (Sigma), beta-naftil acetato (Sigma).	570
<b>Esterases PNPA</b>	Acetato de para-nitrofenil/fosfato de sódio (Sigma)	405

**Fonte:** Brasil (2006)

O controle de qualidade dos testes foi realizado usando cinco fêmeas da colônia Rockefeller em cada placa. A quantificação das enzimas desses mosquitos deverá estar de acordo com o percentil 99 estabelecido para a mesma população.

## 5.8 Pesquisa da mutação no canal de sódio do tipo *kdr*

Como parte da caracterização molecular dos mecanismos de resistência ligada aos piretróides foram pesquisados no gene do canal de sódio seis mutações do tipo *kdr* em quatro diferentes códons (Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Ile1014Fen, Val1016Gli, Val1016Ile) (BRENGUES et al., 2003; LIMA et al., 2011; MARTINS et al., 2009a; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007). Utilizou-se um total de 72 fêmeas da geração F<sub>2</sub>, sendo a metade previamente classificada como resistente e a outra como suscetível ao piretróide cipermetrina (8µg/garrafa) nos bioensaios DD.



### 5.8.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo descrito em Ayres et al. (2003). Os mosquitos foram colocados individualmente em micro tubos de 1.5 ml com o auxílio de uma pinça juntamente com 400 µl de tampão de lise (NaCl 5M, Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, pH 8.0), 7 µl de proteinase k (Sigma) (10 mg/ml) e 72 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. Os mosquitos foram macerados nessa solução e incubados por 8 h em banho-maria a 65 °C. Transcorrido este tempo foram adicionados 420 µl de cloreto de sódio (NaCl) a 5 M e a amostra foi misturada em “vortex” por 1 minuto, para posteriormente ser centrifugada a 11.000 g por 20 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um micro tubo de 2 ml e adicionou-se 1 volume de isopropanol a -20 °C que foi incubado a -20 °C por uma hora. Em seguida centrifugou-se a solução por 20 minutos a 11.000 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500 µl de etanol 70% e centrifugado mais uma vez por 10 minutos na mesma força centrífuga relativa. O sobrenadante foi descartado e deixou-se secar o sedimento. Por fim, o DNA foi ressuspensionado em 150 µl do tampão T.E (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) (Invitrogen/Molecular probes). Todas as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Scientific).

### 5.8.2 Reação de PCR

Os *primers* (*forward* 5'GACAATGTGGATCGCTTCCCG-3' e *reverso* 5'GCACGGACGCAATCTGGC-3') foram empregados para amplificar um fragmento de 622 pares de base (pb) correspondente a parte dos *exons* 20 e 21 do gene do canal de sódio (*Nav*), usando a técnica de *polymerase chain reaction* (PCR) convencional.

Em micro tubos de 0.5 ml colocou-se primeiramente 50 µl de Master Mix® (Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>/Promega), adicionou-se 36 µl de água Mili-q® autoclavada, 4 µl de cada *primer* (10 pmol/µl) e 2 µl de cloreto de magnésio (50 mM, Invitrogen). Depois de homogenizar, transferiu-se 23.5 µl dessa solução para cada micro tubo e adicionou-se 20 ng de DNA extraído. A amplificação foi realizada em termociclador (Biometra T3000®) sob as seguintes condições: 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 64 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Uma temperatura final de extensão de 72 °C foi usada e a reação finalizada a 4 °C. Os resultados dessa amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e usando o Lambda DNA *HindIII*® Ladder (Sigma) como marcador de peso molecular.

### 5.8.3 Sequenciamento e análise para identificação dos pontos de mutação

Os produtos da amplificação foram submetidos a uma reação de sequenciamento, usando o sequenciador capilar ABI 3000<sup>®</sup> (Applied Biosystems), realizado no Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do CPqAM/FIOCRUZ, Pernambuco. As sequências foram analisadas no programa Codon Code Aligner 4.2.2 (32 bit version) para avaliar a qualidade bem como os pontos de mutação.

## 6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho foi submetido ao comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ/PE, e este órgão deliberou não haver implicações éticas envolvendo pesquisa com seres humano (Anexo A). Também foi requerida a anuência do Ministério da Saúde de Cabo Verde para realização das coletas locais de ovos de *Aedes aegypti*. Esse órgão governamental concordou com a realização deste projeto.

Em relação a biossegurança exigida, a manutenção das linhagens de *A. aegypti* em laboratório requer nível de biossegurança 2 (NB-2), requisito atendido pelas instalações do CPqAM/ FIOCRUZ. Os mosquitos em sua forma adulta provenientes de campo foram mantidos em gaiolas de contenção, em salas contendo dispositivos de segurança, como antecâmara e cortina de ar, com acesso restrito às pessoas autorizadas.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Coleta de amostras de ovos de *Aedes aegypti*

Foram coletadas cerca de 2000 ovos de *Aedes aegypti* em todos os municípios da ilha de Santiago, em uma amostra representativa de toda a ilha (Tabela 1). Durante o processo de estabelecimento da população parental, registrou-se uma perda de cerca de 30% do material na fase de pupa. Na etapa da triagem dos adultos não foram encontradas outras espécies de *Aedes*, ficando a amostra constituída apenas por *A. aegypti*.

**Tabela 1-** Distribuição de ovos de *Aedes aegypti* nos diferentes municípios da ilha de Santiago

Municípios	% de OVT positivas	Nº de ovos	Larvas eclodidas
Praia	41%	1090	420
Santa Catarina/São Lourenço dos Órgãos/São Salvador do Mundo	41%	296	115
Ribeira Grande	71%	120	120
Tarrafal	50%	208	44
São Domingos	25%	43	10
Santa Cruz	13%	59	9
São Miguel	33%	336	41
<b>Total</b>	<b>38,3%</b>	<b>2152</b>	<b>759</b>

Fonte: Elaborado pelo Autor

### 7.2 Suscetibilidade a inseticidas com atividade para formas jovens do mosquito

Usando a mortalidade média das larvas para as diferentes concentrações dos três testes para o larvicida *temephos*, estimou-se as  $CL_{50}$  (0,026 mg/l) e  $CL_{90}$  (0,038 mg/l) para as larvas de *A. aegypti* de Santiago. A partir do resultado das  $CL_{50/90}$  foi calculada uma  $RR_{50}=3.7$  e  $RR_{90}=4$  (Tabela 2). Tendo em conta os critérios estabelecidos, a populações de *A. aegypti* da ilha de Santiago apresenta uma resistência baixa ao *temephos*.

Para o biolarvicida Bti foi estimado uma  $CL_{50}=0,011$  mg/l e  $CL_{90}=0,023$  mg/l. A partir desses resultados calculou-se uma  $RR_{90}=0.8$ , sendo a população caracterizada como suscetível, tendo em conta os critérios estabelecidos (Tabela 3).

**Tabela 2**-Concentrações letais do *temephos* e do *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* para 50 (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>) de larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago e respectivas razões de resistência (RR).

Larvicida	População	Nº larvas	<sup>1</sup> CL <sub>50</sub> (I.C) (mg/l)	<sup>1</sup> CL <sub>90</sub> (I.C) (mg/l)	<sup>2</sup> RR <sub>50</sub>	<sup>2</sup> RR <sub>90</sub>	Status
<i>Temephos</i>	Rockefeller	1440	0,007 (0,006-0,007)	0,0095 (0,009-0,010)	1	1	Referência
	<sup>3</sup> CV-F2	2520	0,0260 (0,025 – 0,027)	0,0380 (0,036-0,040)	3.7	4	Resistência Baixa
<i>Bti</i>	RecLab	1020	0,016 (0,012 - 0,020)	0,030 (0,026 - 0,039)	1	1	Referência
	<sup>3</sup> CV-F3	1620	0,011 (0,010-0,012)	0,023 (0,020-0,027)	0.7	0.8	Suscetível

**Fonte:** Elaborado pelo autor

**Legenda:** <sup>1</sup>Concentração letal e respectivos intervalos de confiança; <sup>2</sup>Razão de Resistência; <sup>3</sup>População de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, geração F<sub>2</sub> ou F<sub>3</sub>.

Para o *diflubenzuron* foi estimado uma IE de 1,34 µg/l para 50% (IE<sub>50</sub>) e 2,08 µg/l para 90% (IE<sub>90</sub>) (Tabela 3) dos indivíduos de *A. aegypti* da ilha de Santiago. Foi calculada uma razão de resistência de 3,4 e 2,2 para as IE<sub>50</sub> e IE<sub>90</sub> respectivamente, usando a Rockefeller como referência de suscetibilidade a esse composto.

**Tabela 3**-Concentração do *diflubenzuron* para inibição de emergência para 50 e 90 % de indivíduos de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, e respectivas Razões de Resistências (RR).

População	Nº de larvas	<sup>1</sup> IE <sub>50</sub> (I.C) µg/l	<sup>1</sup> IE <sub>90</sub> (I.C) µg/l	RR <sub>50</sub>	RR <sub>90</sub>
Rockefeller	1630	0,39 (0,29-0,45)	0,94 (0,87-1,03)	1	1
<sup>2</sup> CV-F3	1600	1,34 (1,25-1,43)	2,08 (1,96-2,25)	3,4	2,2

**Fonte:** Elaborado pelo autor

**Legenda:** <sup>1</sup>Concentração de *diflubenzuron* para inibição de emergência e respectivos intervalos de confiança; <sup>2</sup>População de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, geração F<sub>3</sub>.

### 7.3 Suscetibilidade a adulticidas

Para os piretróides, observou-se um rápido do efeito *knock down* para a deltameterina (30min), enquanto que o efeito da cipermetrina atingiu 100% após 1h e 45min de exposição. Com a leitura realizada em 24 horas após a exposição, a média da taxa de mortalidade para deltameterina foi de 72% e para cipermetrina foi de 75% (Tabela 4).

Para o adulticida *malathion*, observou-se que após 45 minutos de exposição 100% dos indivíduos da população de *A. aegypti* de Santiago não sobreviveram. Observou-se ainda

que a taxa de mortalidade aumenta de forma rápida, de 24% nos primeiros 15 minutos para 100% em 45 minutos (Tabela 4).

Tendo em conta os critérios seguidos, a população de *A. aegypti* da ilha de Santiago foi considerada como resistente a cipermetrina e a deltametrina (mortalidade < 80%) e suscetível ao *malathion* (mortalidade  $\geq$  98%).

**Tabela 4**-Mortalidade (%) de mosquitos *Aedes aegypti* de Santiago, Cabo Verde, frente aos adulticidas deltametrina, cipermetrina e *malathion*.

Adulticida (concentração por garrafa)	População	Nº fêmeas	Efeito <i>knock-down</i> /mortalidade por tempo <sup>6</sup>						Status
			15 min	30 min	45 min	1 h	1h45 min	24 horas	
<b>Deltametrina</b> (3 µg/ µl)	<sup>1</sup> Rockefeller	148	84%	100%	—	—	—	100%	Ref.
	<sup>2</sup> CV-F2	191	84%	100%	—	—	—	72%	<sup>3</sup> R
<b>Cipermetrina</b> (8 µg/µl)	<sup>1</sup> Rockefeller	149	94.6%	100%	—	—	—	100%	Ref.
	<sup>2</sup> CV-F2	163	13%	79%	88%	95%	100%	75%	<sup>3</sup> R
<b>Malathion</b> (30 µg/µl)	<sup>1</sup> Rockefeller	156	27%	95%	100%	—	—	NA <sup>5</sup>	Ref.
	<sup>2</sup> CV-F2	197	24%	99%	100%	—	—	NA <sup>5</sup>	<sup>4</sup> S

**Fonte:** Elaborado pelo autor

**Legenda:** <sup>1</sup>Cepa Rockefeller referência de suscetibilidade a inseticidas químicos; <sup>2</sup>População de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago; <sup>3</sup>Resistente; <sup>4</sup>Suscetível; <sup>5</sup>Não se aplica; <sup>6</sup> Para os piretróides avaliou-se o efeito *knock down* no tempo até o máximo de 1h45min e mortalidade após 24h da exposição. Para o *malathion* foi avaliado a mortalidade nos até 45min de exposição.

#### 7.4 Atividade de enzimas de detoxificação e sítio-alvo

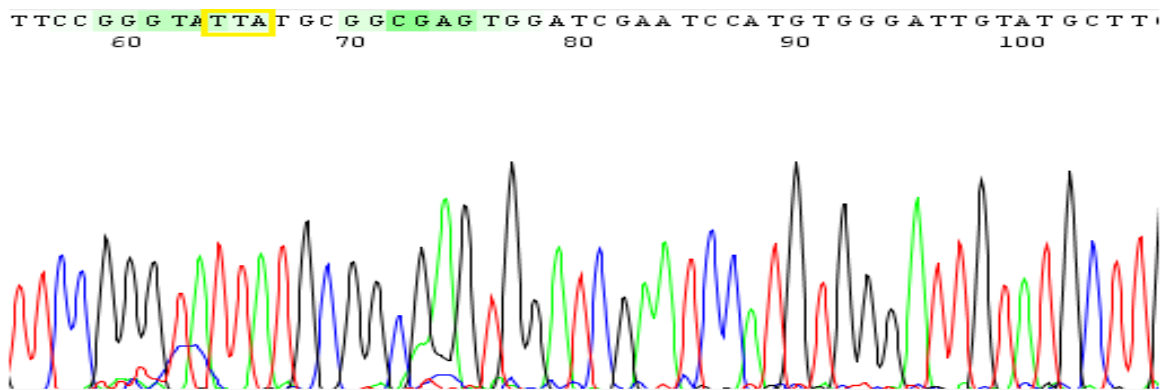
Os testes de atividade de enzimas de detoxificação foram realizados com o objetivo de verificar alterações nas enzimas ligadas a resistência metabólica. Foi quantificada a atividade das enzimas GTSs, esterases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e PNPA) e MFOs. Também avaliou-se a taxa de inibição da AChE.

Observou-se que 25% dos indivíduos da população de *A. aegypti* de Santiago apresentavam uma atividade superior ao percentil 99 da Rockefeller para as GTSs. Para as esterases beta e alfa, respectivamente 17% e 19% dos indivíduos apresentaram atividade acima da referência e para as MFOs 18%. Com esses resultados e seguindo os critérios estabelecidos em Brasil (2006), as atividades dessas enzimas foram consideradas como sendo alteradas. No entanto, as esterases PNPA e AChE, com apenas 7% e 6% de indivíduos acima do percentil 99 da referência, respectivamente, foram consideradas como inalteradas (Tabela 5).

### 7.5 Frequência de mutações no canal de sódio do tipo *kdr*

Conseguiu-se a amplificação de um fragmento de 622 pb a partir das sequências genômicas dos exóns 20 e 21 do gene do canal de sódio. Os produtos das PCRs foram sequenciados e analisados, não sendo detectada a presença de nenhuma das seis mutações pesquisadas (Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Ile1014Fen, Val1016Gli, Val1016Ile). Em cinco indivíduos fenotipados como resistentes e seis dos suscetíveis a cipermetrina foram detectadas mutações sinônimas no códon 982 (Figura 18).

**Figura 18**-Eletroferograma destacando a mutação sinonima no codón 982, no canal de sódio de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago



**Fonte:** Elaborado pelo autor

**Tabela 5-**Atividade das enzimas esterases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e PNPA), glutathione S-transferases, oxidases de função mista e acetilcolinesterase na população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago e o percentual de indivíduos com alteração em comparação com o percentil 99 da Rockefeller

<b>Enzima</b>	<b>Cepa Geração</b>	<b>Nº fêmeas</b>	<b>p99<sup>1</sup></b>	<b>%&gt; p99<sup>2</sup></b>	<b>Classificação</b>
<b>GTSs</b> (mmol/"/mg ptn)	<sup>4</sup> Rockefeller	173	2,23	--	<b>Referência</b>
	<sup>3</sup> CV-F2	158	2,86	25%	<b>Alterada</b>
<b><math>\beta</math>-esterase</b> (nmol/mg ptn)	<sup>4</sup> Rockefeller	156	129,74	--	<b>Referência</b>
	<sup>3</sup> CV-F2	157	185,81	17%	<b>Alterada</b>
<b><math>\alpha</math>-esterase</b> (nmol/mg ptn)	<sup>4</sup> Rockefeller	157	72,17	--	<b>Referência</b>
	<sup>3</sup> CV-F2	159	106,59	19%	<b>Alterada</b>
<b>PNPA-esterase</b> (Abs/"/mg ptn)	<sup>4</sup> Rockefeller	80	8,31	--	<b>Referência</b>
	<sup>3</sup> CV-F2	95	10,71	7%	<b>Sem alteração</b>
<b>MFOs</b> (nmoles cit/mg ptn)	<sup>4</sup> Rockefeller	161	11,72	--	<b>Referência</b>
	<sup>3</sup> CV-F2	158	13,92	18%	<b>Alterada</b>
<b>AChE</b> <b>% inibição</b>	<sup>4</sup> Rockefeller	136	98,74	--	<b>Referência</b>
	<sup>3</sup> CV-F2	69	99,33	6%	<b>Sem alteração</b>

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** <sup>1</sup>Percentil 99 da caracterização das enzimas; <sup>2</sup>Taxa de *A. aegypti* da ilha de Santiago com percentil 99 maior que o do Rockefeller; <sup>3</sup>População de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde. <sup>4</sup> Colônia Rockefeller, referência de suscetibilidade a inseticidas químicos.



## 8 DISCUSSÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor do DENV, agente etiológico da dengue (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). No arquipélago de Cabo Verde esta espécie esteve envolvida na epidemia de dengue ocorrida no final do ano 2009. Corroborando os estudos anteriores (ALVES et al., 2010; DIA et al., 2012; RIBEIRO et al., 1980), os nossos resultados vêm mais uma vez confirmar a presença desse vetor na ilha de Santiago (Tabela 1). Em Cabo Verde, o mosquito *A. aegypti* apresenta uma estreita relação com o homem, sendo encontrado principalmente em criadouros artificiais como os usados para o armazenamento de água, assim como apontado por Ribeiro et al. (1980). No continente africano essa espécie encontra-se distribuída em praticamente todos os países (AMARASINGHE et al., 2011; WERE, 2012), sendo que em muitas cidades africanas, o não planejamento urbano e a falta de gestão eficaz de resíduos têm levado a uma multiplicação de criadouros e consequentemente ao aumento na proliferação de *A. aegypti* (KAMGANG et al., 2010). Em Camarões, por exemplo, estudos realizados demonstraram que a densidade de *A. aegypti* é significativamente elevada nas áreas onde há muitas construções, sendo a maioria dos criadouros peridomiciliares constituídos principalmente por pneus e recipientes descartáveis (KAMGANG et al., 2010).

O número de ovos coletados para este estudo não foi elevado, cerca de 2000 para toda a ilha, o que pode ser explicado pelo fato de as coletas das amostras terem sido realizadas durante a estação seca, nos meses de março a maio. Estudos têm demonstrado que fatores ambientais e mudança das estações do ano influenciam na densidade desse mosquito (DEGALLIER et al., 2012; OO et al., 2011). Em um estudo de monitoramento realizado pelo Grupo de Investigação em Doenças Tropicais da Universidade Jean Piaget de Cabo Verde (GIDPiaget), durante os meses de março a setembro de 2013 no município de Praia, ilha de Santiago, observou-se uma elevada positividade de ovitrampas (> 84%) nos meses de maior pluviosidade (Julho, Agosto e Setembro) (dados não publicados). Os criadouros artificiais, não dependentes diretamente das chuvas, constituem os principais reservatórios que possibilitam a manutenção de populações de *A. aegypti* durante a estação seca (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998; RIBEIRO et al., 1980) sendo esse o possível cenário encontrado na ilha de Santiago e medidas no sentido de reduzir ou eliminar esses criadouros são de grande valia para o controle desse vetor.

Realizando a análise morfológica dos indivíduos coletados, não foi detectada a presença de outras espécies de mosquitos, nomeadamente: o *Aedes albopictus* e *Aedes*

*caspius*. O primeiro nunca foi descrito em Cabo Verde, embora esteja presente em países vizinhos (KAMGANG et al., 2011; TOTO et al., 2003). A espécie de mosquito *A. caspius*, anteriormente descrita na ilha de Santiago (ALVES et al., 2010), não foi detectada usando as OVTs, o que pode ser atribuído a uma possível baixa densidade dessa espécie no período das coletas, ou ainda, ser um indicador de que *A. aegypti* é mais atraído à ovipositar nas OVTs usadas. Em trabalhos realizados pelo GIDPiaget na ilha de Santiago, usando o mesmo método de coleta de ovos, também não foram detectadas outras espécies de mosquitos colonizando essas ovitrampas (dados não publicados).

Uma vez que não existe ainda vacina e nem tratamento específico para a dengue, o controle vetorial torna-se um dos principais componentes no seu controle, e os inseticidas têm um importante papel neste contexto (BISSET, 2002; HEMINGWAY; RANSON, 2005; KYLE; HARRIS, 2008). Em Cabo Verde, desde o ano 2009 (ano da epidemia de dengue) o organofosforado *temephos* (Abate) e o piretróide deltametrina têm sido usados no controle de população de *A. aegypti*. Para o Programa Integrado de Luta Contra as Doenças Transmitidas por Vetores e Problemas da Saúde Associados ao Ambiente, foram usados no ano de 2013 cerca de 440 kg de *temephos* na ilha de Santiago para o controle de vetores (CABO VERDE, 2012a).

Com os resultados obtidos, observa-se que a população desse vetor apresenta uma resistência considerada baixa ao *temephos* ( $RR_{90} = 4$ ). Embora baixa, ela é um indicativo da emergência de resistência na população de *A. aegypti* da ilha de Santiago. Este resultado refuta as análises realizadas no ano 2010 que apontaram para um *status* de suscetibilidade a esse composto, de acordo com informações do Ministério da Saúde do arquipélago (CABO VERDE, 2012a). Esse resultado é o primeiro a detectar a resistência ao *temephos* em populações de *A. aegypti* de Cabo Verde e constitui um alerta para as autoridades no sentido de adotarem medidas para reverter esse quadro.

Nos países africanos, as poucas informações sobre o *status* de suscetibilidade de populações de *A. aegypti* têm demonstrado que esses são susceptíveis ao *temephos* (KAMGANG et al., 2011; MOUCHET et al., 1971). Por exemplo, em Camarões, testes realizados com populações de *A. aegypti* provenientes das cidades de Garoua, Bertoua, Yaoundé e Bafia apresentaram  $RR_{95} < 3$ ; e no Gabão, populações da cidade de Libreville apresentaram  $RR_{95} = 1.13$  (KAMGANG et al., 2011). Por outro lado, em países como Brasil (LIMA et al., 2011), Malásia (DHANG et al., 2008), Argentina (LLINAS et al., 2010) e Indonésia (MULYATNO et al., 2012) já foram descritos casos de populações de *A. aegypti* resistentes ao *temephos*.

Observou-se que a população de *A. aegypti* da ilha de Santiago é susceptível ao biolarvicida Bti ( $RR_{90}=0,8$ ). O mesmo cenário é observado em outros países africanos, onde populações de *A. aegypti*, resistentes a outros compostos, são susceptíveis ao Bti. Por exemplo, em Camarões e Gabão testes com várias populações de diferentes cidades desses países apresentaram  $RR_{95} < 3$  (KAMGANG et al., 2011). De forma similar aos nossos resultados, em estudos realizados com populações de *A. aegypti* no nordeste brasileiro que apresentaram resistência ao *temephos* detectou-se susceptibilidade ao Bti com  $RR_{95} < 2$  (ARAUJO et al., 2013). Também em outras populações tem-se observado o mesmo cenário (LOKE et al., 2010). Esse biolarvicida poderá constituir uma alternativa ao uso do *temephos* no programa de controle de *A. aegypti*, uma vez que não foi detectada resistência e não há registro do seu uso para o controle de populações de *A. aegypti* no arquipélago.

Para o *diflubenzuron* observou-se que a  $IE_{90}$  da população de campo é cerca de duas vezes maior ( $RR_{90} = 2,2$ ) que a  $IE_{90}$  da colônia Rockefeller, referência de suscetibilidade. Esse composto também poderá constituir uma alternativa ao uso do *temephos*. Não existe registro de uso desse IGR na população de *A. aegypti* de Cabo Verde, o que poderá justificar o RR encontrado. Esse tem-se demonstrado muito eficaz na inibição de eclosão de larvas de espécies do gênero *Aedes* e *Culex* (KAMAL; KHATER, 2010; SUMAN et al., 2013).

Os resultados para os bioensaios com os piretróides demonstram que a população de *A. aegypti* estudada é resistente a deltametrina (72%) e a cipermetrina (75%). Essa resistência detectada torna-se preocupante uma vez que a deltametrina é usada no controle para adultos de *A. aegypti* em Cabo Verde e análise realizada anteriormente por DIA et al. (2012) no ano de 2009 demonstrava que essa população era totalmente suscetível a esse composto (100% de mortalidade). No Programa Integrado de Luta Contra as Doenças Transmitidas por Vetores e Problemas da Saúde Associados ao Ambiente foi usado no ano de 2013 cerca de 410 litros de deltametrina, destinados ao controle de mosquitos na ilha de Santiago. Esses resultados indicam uma rápida evolução dessa resistência. Em estudo realizado por Montella et al. (2007) observou-se um cenário idêntico em populações brasileiras de *A. aegypti* que apresentaram uma diminuição na susceptibilidade a piretróides após pouco tempo de uso (2001 a 2003).

Para além do uso da deltametrina direcionado ao controle de *A. aegypti*, vários outros piretróides são usados no controle de pragas agrícolas e a própria deltametrina no programa de controle de *Anopheles arabiensis*, principal vetor da malária em Cabo Verde, em execução há mais tempo. Em Cabo Verde, essas duas situações poderão estar a contribuir, de forma indireta, para o surgimento desta resistência exercendo uma maior pressão de seleção sobre o

mosquito *A. aegypti* (CABO VERDE, 2012a). Para essa classe de inseticidas há vários registros de populações de campo resistentes em diversos países (BRAGA et al., 2004; BRENGUES et al., 2003; LIMA et al., 2006; LIMA et al., 2011; MACORIS MDE et al., 2003; PROPHIRO et al., 2011). No continente africano foram descritas populações do mosquito *Aedes aegypti* da Costa do Marfim resistentes a deltametrina e, no Senegal, foi verificado um *status* de “verificação de susceptibilidade” aos piretróides deltametrina, com uma mortalidade de 94.5% e a lambda-Cyhalothrin com mortalidade de 81.6% (DIA et al., 2012; KONAN et al., 2012).

Para o organofosforado *malathion* não foi detectada resistência na população estudada. Em Cabo Verde o *malathion* não tem sido usado para o controle de *A. aegypti* (CABO VERDE, 2012a), sendo o *temephos* o único organofosforado destinado a esse fim. Em análise realizada com essa mesma população, no ano de 2009, usando o organofosforado fenitrothion, observou-se, também, que ela é sensível a esse composto (100% de mortalidade) (DIA et al., 2012). Tem-se, também, registrado populações de *A. aegypti* suscetíveis ao *malathion* em países como Colômbia (SANTACOLOMA; CHAVES; BROCHERO, 2012) Malásia (RONG et al., 2012) e Cuba (RODRIGUEZ et al., 2010). No entanto, populações do mosquito *A. aegypti* podem se tornam resistentes a esses compostos quando ele exerce uma elevada pressão de seleção (HIDAYATI et al., 2011). Na Venezuela, por exemplo, populações desse mosquito tem-se mostrado resistentes a esse composto (ALVAREZ et al., 2013).

Em um estudo de revisão da literatura, referente a resistência a inseticidas em *A. aegypti* observou-se que, para a maioria dos artigos consultados, este mosquito apresentava um *status* de resistência a inseticidas da classe do organofosforados e piretróides (RANSON et al., 2010). Com os resultados obtidos, observa-se que a população da ilha de Santiago é resistente ao organofosforado *temephos* e aos piretróides deltametrina e cipermetrina, sendo esses os inseticidas usados no controle de *A. aegypti* em Cabo Verde.

Subjacente a resistência aos inseticidas químicos, existem quatro mecanismos sendo mediados pelas enzimas de detoxificação considerados os de maior importância (BRAGA; VALLE, 2007b). Os nossos resultados mostraram alterações na atividade das enzimas esterase alfa (19%) e beta (17%) ligada ao processo de detoxificação de xenobióticos. Em vários estudos realizados têm-se demonstrado o envolvimento destas enzimas na resistência ao *temephos* em *A. aegypti* (BISSET et al., 2001; DHANG et al., 2008; LIMA et al., 2011). Por exemplo, em estudo realizado por Rodriguez et al. (2002) com população de *A. aegypti* de Santiago de Cuba, submetida a uma pressão de seleção com *temephos* por seis gerações, é

apontada uma relação entre o aumento da atividade das esterases e a resistência ao *temephos*. Essa mesma relação foi encontrada em estudos realizados por Melo-Santos et al. (2010), mas, desta vez, conjuntamente com outra família de enzimas, as GSTs. Possivelmente, esse mecanismo esteja mediando a resistência ao *temephos* encontrada na população de *A. aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde. Embora os níveis de alteração encontrada nessas enzimas não sejam muito elevados, constata-se também que, a resistência ao *temephos* é considerada baixa. Em estudo realizado com populações de *A. aegypti* da Costa Rica detectou-se associação entre a alteração da atividade dos níveis das esterases com a resistência ao *temephos* (BISSET et al., 2013).

As MFOs constituem outra família de enzimas envolvidas na detoxificação de compostos xenobióticos nos mosquitos (BERGE; FEYEREISEN; AMICHOT, 1998). Os nossos resultados mostraram uma alteração na atividade dessas enzimas (18%), e esta pode estar envolvida na resistência aos piretróides (cipermetrina e deltametrina) detectada nos bioensaios. Essas enzimas têm sido apontadas como estando envolvidas na resistência aos piretróides em *A. aegypti* (BARIAMI et al., 2012; BROGDON; MCALLISTER, 1998a). Estudos realizado por Rodriguez et al. (2005), usando uma população de *A. aegypti* submetida a pressão de seleção pela deltametrina por 12 gerações, apontou o envolvimento das MFOs na resistência a esse composto. No entanto, em estudos realizados com populações de campo de *A. aegypti* resistentes a piretróides não se tem conseguido estabelecer uma relação com a alteração na atividade das MFOs (ALVAREZ et al., 2013; BISSET et al., 2013).

Além das alterações observadas nas esterases e nas MFO's, também foi detectada alteração na família das enzimas GSTs (25%). Essa foi a maior alteração registrada para as enzimas ligadas aos mecanismos de detoxificação. Estudos demonstraram que as GSTs estão envolvidas na resistência ao DDT e piretróide em populações de *A. aegypti* (BRENGUES et al., 2003; BROGDON; MCALLISTER, 1998a; LUMJUAN et al., 2005). Por exemplo, Lumjuan et al. (2005), em estudo realizado com populações do norte da Tailândia resistentes ao piretróide permetrina e ao DDT foi detectada uma superexpressão de GSTs associada as essas resistência. Mesmo em outras espécies de insetos, como por exemplo *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), também tem-se demonstrado que o aumento das GSTs confere resistência aos piretróides (VONTAS; SMALL; HEMINGWAY, 2001). A atividade elevada das GSTs poderá estar ligada então à resistência aos piretróides detectadas nos nossos resultados e a resistência ao DDT já anteriormente descrita para essa população (DIA et al., 2012).

O aumento da atividade das enzimas de detoxificação poderá estar ligado a exposição a outros xenobióticos e não apenas aos inseticidas (MARTINS et al., 2009b). Na metabolização de agroquímicos está envolvido um grande número de sistemas enzimáticos, tais como as MFOs, GSTs e as esterases (WHEELLOCK; SHAN; OTTEA, 2005). Sendo a ilha de Santiago uma área iminentemente agrícola, o uso de pesticidas (CABO VERDE, 2012b) poderá estar selecionando de forma indireta mosquitos com maior capacidade de detoxificação nas zonas próximas a áreas agrícolas. Para além dos inseticidas e agrotóxicos que as populações de *A. aegypti* estão expostas, em Cabo Verde, o controle das populações desse mosquito é realizado também recorrendo ao uso de derivados de petróleo (gasóleo) (CABO VERDE, 2009). Esses três fatores poderão estar na origem das alterações na atividade das enzimas e a consequente resistência ao *temephos* e aos piretróides detectados nesse estudo.

O canal de sódio é o sítio alvo dos piretróides e do DDT, o que poderá indicar a existência de resistência cruzada entre esses dois tipos de inseticidas em uma população com mecanismo de resistência do tipo insensibilidade ao sítio alvo, como é o caso das mutações do tipo *kdr* (BRAGA; VALLE, 2007b; BRENGUES et al., 2003). Embora as mutações do tipo *kdr* tenham sido encontradas em populações de *A. aegypti* resistentes a piretróides e DDT em diversos países (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; LIMA et al., 2011; MARTINS et al., 2009a; MARTINS et al., 2009b; RAJATILEKA et al., 2008), esses não foram detectados na população da ilha de Santiago, Cabo Verde, não obstante a população ser considerada como resistente a piretróides, como demonstra os nossos resultados, e ao DDT, como demonstrado nos testes anteriormente realizados por Dia et al. (2012). A ausência de mutações do tipo *kdr* sugere que a resistência a esses compostos, na população de *A. aegypti* de Santiago, poderá estar sendo mediada pelo mecanismo metabólico, via enzimas ligadas a detoxificação de xenobióticos.

Os nossos resultados constituem um alerta para as autoridades sanitárias de Cabo Verde pelo fato de que, pela primeira vez em estudos realizados no país, foi detectada a resistência aos piretróides deltametrina e cipermetrina e ao organofosforado *temephos* em *A. aegypti* do arquipélago, o que alerta ainda para a necessidade de medidas que evitem o estabelecimento desta resistência. A criação de uma rede para o monitoramento dessa resistência, a exemplo das já existentes em países como o Brasil, e a realização do manejo da resistência usando compostos com sítios de ação diferentes são recomendações que saem a partir dos resultados deste estudo.

## 9 CONCLUSÕES

A população de *A. aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, é resistente aos inseticidas usados atualmente no programa de controle, no caso a deltametrina como aduictida e o *temephos* como larvica, e suscetível a agentes de controle sem histórico de uso na ilha, no caso o Bti, *diflubenzuron* e *malathion*;

Níveis de atividade aumentadas das enzimas MFO's, Esterases ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e GST's sugerem que essas poderão ter um papel na resistência detectada e que o mecanismo ligado a insensibilidade do sítio-alvo, por alterações no canal de sódio e na enzima AChE, não está envolvido na resistência nessa população;

Não foi detectada nenhuma das mutações do tipo *kdr* pesquisadas, pelo que se conclui que esse mecanismo não esteja mediando a resistência aos piretróides ou ao DDT descrito anteriormente;

A hipótese inicialmente traçada não se confirma, dado que o mosquito *A. aegypti* da ilha de Santiago apresentou resistência aos piretróides testados e ao organofosforado *temephos*;

Os resultados do estudo apontam para a necessidade de se manter o monitoramento das populações e realizar estratégias de manejo da resistência.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, L. C. et al. Resistance to malathion and deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from western Venezuela. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 50, n. 5, p. 1031-1039, 2013.
- ALVES, J. et al. Mosquito fauna on the Cape Verde Islands (West Africa): an update on species distribution and a new finding. Journal of vector ecology, Santa Ana, v. 35, n. 2, p. 307-312, 2010.
- AMARASINGHE, A. et al. Dengue virus infection in Africa. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 17, n. 8, p. 1349-1354, 2011.
- ARAÚJO, A. et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. Parasites & Vectors, London, v. 6, n. 1, p. 297, 2013.
- AYRES, C. F. et al. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.
- BARIAMI, V. et al. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 6, p. e1692, 2012.
- BECKER, N. et al. Mosquitoes and their control. New York: Plenum Publishers, 2003.
- BECKER, N. et al. Mosquitoes and their control. 2. ed. New Yourk: Springer-Verlag, 2010.
- BERGE, J. B.; FEYEREISEN, R.; AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Philosophical Transactions of the Royal Society of London London, v. 353, n. 1376, p. 1701-1705, 1998.
- BISSET, J. A. Correct use of insecticides: management of resistance. Revista Cubana Medicina Tropical, Habana, v. 54, n. 3, p. 202-219, 2002.
- BISSET, J. A. et al. Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 50, n. 2, p. 352-361, 2013.
- BISSET, J. A. et al. High esterases as mechanism of resistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* strains. Revista cubana de medicina tropical, Habana, v. 53, n. 1, p. 37-43, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.



BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico de controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Rio de Janeiro, v. 16, p. 113-118, 2007a.

\_\_\_\_\_. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Rio de Janeiro, v. 16, p. 279-293, 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*. Brasília, 2006.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, Oxford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRENGUES, C. et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. Medical and veterinary entomology, Oxford, v. 17, n. 1, p. 87-94, 2003.

BROGDON, W. G. Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. Parasitology today, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 56-60, 1989.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. Emerging infectious diseases, Fresno v. 4, n. 4, p. 605-613, 1998a.

\_\_\_\_\_. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. Journal of the American Mosquito Control Association, Atlanta, v. 14, n. 2, p. 159-164, 1998b.

CABO VERDE. Ministério do Ambiente Agricultura e Pescas. Livro Branco sobre o Estado do Ambiente em Cabo Verde. Praia , 2004.

CABO VERDE. Ministério da Saúde. Relatório Estatístico 2009. Praia, 2010.

\_\_\_\_\_. Relatório Estatístico 2010. Praia, 2011.

\_\_\_\_\_. Plano integrado de luta contra as doenças transmitidas por vectores e problemas de saúde associados ao meio ambiente. Praia, 2012a.

CABO VERDE. Ministério do Desenvolvimento Rural. Lista de produtos fitossanitários autorizados. Praia, 2012b.

CABO VERDE. Ministério do Ambiente, Habitação e Ordenamento do Território. Sistema de Informação Territorial de Cabo Verde. Praia, 2013. Disponível em: < <http://visor.sit.gov.cv/>>. Acesso em: 11 ago. 2013.

CABO VERDE. Resolução nº 38/2009, 21 de dezembro 2009. Bolotim Oficial [da República de Cabo Verde], Praia, v. 1, n. 48, 2009.

CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 13-25, 2000.

CLEMENTS, A. N. The biology of Mosquitoes, Development, Nutrition and Reproduction. London: CABI Publishing, 2000.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. D. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro Fiocruz: 1998.

DE BARJAC, H.; LARGET-THIÉRY, I. Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Mimioographed document, Santa Ana, 1984. WHO/VCB/84.892.

DEGALLIER, N. et al. The influence of local environment on the aging and mortality of *Aedes aegypti* (L.): case study in Fortaleza-CE, Brazil. Journal of vector ecology, v. 37, n. 2, p. 428-441, 2012.

DHANG, C. C. et al. Biochemical Detection of Temephos Resistance in *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Linnaeus) from Dengue-endemic Areas of Selangor State, Malaysia. Tropical medicine and parasitology, Stuttgart, v. 1, n.3, p.6-20, 2008.

DIA, I. et al. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* populations from Senegal and Cape Verde Archipelago. Parasites & vectors, London, v. 5, p. 238, 2012.

ENDERSBY, N. M.; HOFFMANN, A. A. Effect of Wolbachia on insecticide susceptibility in lines of *Aedes aegypti*. Bulletin of entomological research, London, v. 103, n. 3, p. 269-277, 2013.

FAY, R.; PERRY, S. Studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. Mosquito News, New York, v. 25, p. 8, 1965.

FERREIRA, G. L. Global dengue epidemiology trends. Revista Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, São Paulo v. 54, Supl. 18, p. S5-6, 2012a.

FERREIRA, G. L. C. Global dengue epidemiology trends. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 54, Supl. 18, p.S5-6, 2012b. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23011450>>. Acesso em: 18 Oct. 2013.

FERREIRA, W. F. C.; SOUSA, J. C. F. Microbiologia 3. ed. Lidel, Lisboa, 2003.

FINNEY, D. J. Probit analysis. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

FONTOURA, N. G. et al. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 107, n. 3, p. 387-395, 2012.

FORATTINI, O. P. Entomologia médica. São Paulo: EDUSP, 1962. v. 1.

FRANCO, L. et al. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. European communicable disease bulletin, Saint-Maurice, v. 15, n. 7, 2010.

GERVAIS, J. A. et al. Malathion technical fact sheet. 2009. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/malatech.pdf>>. Acesso em 15 fev. 2014.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. Emerging themes in epidemiology, London, v. 2, n. 1, p. 1, 2005.

HAGEDORN, H. H. Biology of Disease vectors. San Diego: Elsevier, 2005.

HALSTEAD, S. B. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimor, v. 23, n. 5, p. 974-982, 1974.

HARRIS, A. F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimor, v. 83, n. 2, p. 277-284, 2010.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. Medical and veterinary entomology, Oxford, v. 12, n. 1, p. 1-12, 1998.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annual review of entomology, Palo Alto, v. 45, p. 371-391, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICAS (Cabo Verde). Apresentação de dados preliminares do IVº RGPH 2010. Praia, 2010.

\_\_\_\_\_. Chemical Control of Vectors and Mechanisms of Resistance Biology of Disease Vectors in Biology of Disease vectors. San Diego: Elsevier, 2005.

HIDAYATI, H. et al. Insecticide resistance development in *Aedes aegypti* upon selection pressure with malathion. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Hong Kong, v. 28, n. 2, p. 425-437, 2011.

HUANG, Y. M. The subgenus Stegomyia of Aedes in the Afrotropical Region with keys to the species. San Diego: Magnolia, 2004.

HUBER, K. et al. *Aedes aegypti* in Senegal: genetic diversity and genetic structure of domestic and sylvatic populations. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimor, v. 79, n. 2, p. 218-229, 2008.

INWANG, E. E.; KHAN, M. A.; BROWN, A. W. DDT-resistance in West African and Asian strains of *Aedes aegypti* (L.). Bulletin of the World Health Organization, Geneva, v. 36, n. 3, p. 409-421, 1967.

KAMAL, H. A.; KHATER, E. I. The biological effects of the insect growth regulators; pyriproxyfen and diflubenzuron on the mosquito *Aedes aegypti*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, Cairo, v. 40, n. 3, p. 565-574, 2010.

KAMGANG, B. et al. Geographic and ecological distribution of the dengue and chikungunya virus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in three major Cameroonian towns. Medical and veterinary entomology, Oxford, v. 24, n. 2, p. 132-141, 2010.

KAMGANG, B. et al. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. Parasites & Vectors, London, v. 4, p. 79, 2011.

KARATOLOS, N. et al. Mutations in the sodium channel associated with pyrethroid resistance in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. Pest management science, West Sussex, v. 68, n. 6, p. 834-838, 2012.

KARUNARATNE, S. H.; HEMINGWAY, J. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. Bulletin of the World Health Organization, Geneva, v. 79, n. 11, p. 1060-1064, 2001.

KARUNARATNE, S. H. P. P. Insecticide resistance in insects: A review. Ceylon Journal of Science, Colombo, v. 25, p. 72-99, 1998.

KOKERNOT RH, S. K., WEINBREN MP. Neutralizing antibodies to arthropod-borne viruses in human beings and animals in the Union of South Africa. Journal of Immunology, Baltimor, v. 77, p. 5 313-323, 1956.

KONAN, L. Y. et al. *Aedes aegypti* susceptibility to insecticide from Abidjan City, Cote D'ivoire. Vector borne and zoonotic diseases, Larchmont, v. 12, n. 4, p. 325-329, 2012.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. Annual review of microbiology, Palo Alto, v. 62, p. 71-92, 2008.

LIMA, E. P. et al. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceara State. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.

LIMA, E. P. et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. Parasites & Vectors, London, v. 4, p. 5, 2011.

LLINAS, G. A. et al. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 113-116, 2010.

LOKE, S. et al. Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Hong Kong, v. 27, p. 493 - 503, 2010.

LUMJUAN, N. et al. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. Insect biochemistry and molecular biology, Oxford, v. 35, n. 8, p. 861-871, 2005.

LUMJUAN, N. et al. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. Insect biochemistry and molecular biology, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1026-1035, 2007.

MACORIS MDE, L. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.

- MARCOMBE, S. et al. Pyrethroid resistance reduces the efficacy of space sprays for dengue control on the island of Martinique (Caribbean). PLoS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 5, n. 6, p. e1202, 2011.
- MARCOMBE, S. et al. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. PLoS One, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e30989, 2012.
- MARTINEZ-TORRES; A. L. DECONSHIRE; WILLIAMSON, M. S. Molecular Studies of Knockdown Resistance to Pyrethroids: Cloning of Domain II Sodium Channel Gene Sequences from Insects. Pesticide science, London, v. 55, p. 265-270, 1997.
- MARTINEZ-TORRES, D. et al. Voltage-dependent Na channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. Pesticide Science, London, v. 55, p. 1012-1020, 1999.
- MARTINEZ-TORRES, D. et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect molecular biology, Oxford, v. 7, n. 2, p. 179-184, 1998.
- MARTINS, A. J. et al. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. Pest management science, West Sussex, v. 64, n. 6, p. 676-680, 2008.
- MARTINS, A. J. et al. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. Tropical medicine & international health, Oxford, v. 14, n. 11, p. 1351-1355, 2009a.
- MARTINS, A. J. et al. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in *Aedes aegypti* pyrethroid-resistant from Brazil. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 81, n. 1, p. 108-115, 2009b.
- MAZZARRI, M. B.; GEORGHIOU, G. P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno v. 11, n. 3, p. 315-322, 1995.
- MELO-SANTOS, M. et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Tropica, Basel, v. 113, p. 180 - 189, 2010.
- MERZENDORFER, H. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. Insect Science, Carlton South, v. 20, n. 2, p. 121-138, 2013.
- MONTELLA, I. R. et al. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.
- MOUCHET, J. et al. Sensitivity of and resistance to insecticides of *Aedes aegypti* in West Africa and methods of control of the vector. Bulletin of the World Health Organization, Geneve, v. 45, n. 3, p. 394-404, 1971.

MULYATNO, K. C. et al. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) larvae to temephos in Surabaya, Indonesia. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health, Bangkok, v. 43, n. 1, p. 29-33, 2012.

NORMILE, D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. Science, Washington, DC, v. 342, n. 6157, p. 415, 2013.

OBERLANDER, H.; SILHACEK, D. Insect Growth Regulators. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. Alternatives to Pesticides in Stored-Product IPM: Springer US: New York, 2000.

OO, T. T. et al. Factors influencing the seasonal abundance of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and the control strategy of dengue and dengue haemorrhagic fever in Thanlyin Township, Yangon City, Myanmar. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Hong Kong, v. 28, n. 2, p. 302-311, 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/014/X8085E/X8085E.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2013

\_\_\_\_\_. FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides, deltamethrin. 2009. Disponível em: <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Specs/Deltamethrin](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Deltamethrin)>. Acesso em: 20 nov. 2013

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Adult Mosquitoes to Organochlorine, Organophosphate and Carbamate Insecticides - Diagnostic test. Geneve, 1981. (WHO/VBC781.06).

\_\_\_\_\_. Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of the vectors. Geneve, 1984.

\_\_\_\_\_. WHO specifications and evaluations for public health pesticides, malathion. 2004. Disponível em: <[http://www.who.int/whopes/quality/en/Malathion\\_july04.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/en/Malathion_july04.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2013.

\_\_\_\_\_. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneve, 2009a.

\_\_\_\_\_. Dengue fever, Cape Verde. Weekly Epidemiological Record, Geneve, v. 84, n. 45, p. 469, 2009b.

\_\_\_\_\_. Dengue in Africa: emergence of DENV-3, Cote d'Ivoire, 2008. Weekly Epidemiological Record, Geneve, v. 84, n. 11-12, p. 85-88, 2009c.

\_\_\_\_\_. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, 2009

\_\_\_\_\_. Report on global surveillance of epidemic-prone Infectious diseases - dengue and dengue haemorrhagic fever. Geneve, 2011a. Disponível em: <[http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR\\_ISR\\_2000\\_1/en/index2.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR_ISR_2000_1/en/index2.html)>. Acesso em: 6 fev. 2012.

\_\_\_\_\_. Who specifications and evaluations for public health pesticides. Geneve, 2011b. Disponível em: <[http://www.who.int/whopes/quality/Temephos\\_eval\\_only\\_June\\_2011.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/Temephos_eval_only_June_2011.pdf)>. Acesso em: 7 fev. 2012.

\_\_\_\_\_. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. Geneve, 2012.

\_\_\_\_\_. Dengue and severe dengue. *WHO Media centre*, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>>. Acesso em: 6 fev. 2013.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. World health statistics quarterly, Geneve, v. 50, n. 3-4, p. 161-169, 1997.

PONLAWAT, A.; SCOTT, J. G.; HARRINGTON, L. C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 42, n. 5, p. 821-825, 2005.

PROPHIRO, J. S. et al. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 44, n. 3, p. 300-305, 2011.

RAJATILEKA, S. et al. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. Acta tropica, Basel, v. 108, n. 1, p. 54-57, 2008.

RANSON, H. et al. Insecticide resistance in dengue vectors. Tropical Diseases Research to Foster Innovation & Knowledge Application, Geneve, v. 1, n.1, 2010.

RECHCIGL, J. E.; RECHCIGL, N. A. Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. Washington DC: Lewis Publishers, 2000.

RIBEIRO, H. et al. Os mosquitos de Cabo Verde, sistemática, distribuição, bioecologia e importância médica. Lisboa: Estudos Ensaios e Documentos, 1980.

ROCHA, H. D. R. Ovitampa. Mindelo, 2013a. 1 Fotografia color.

\_\_\_\_\_. Cuba com larvas de Aedes spp. Recife, 2013b. 1 Fotografia color.

\_\_\_\_\_. Gaiolas de contenção para Aedes spp. Recife, 2013c. 1 Fotografia color.

\_\_\_\_\_. Palheta com ovos de Aedes aegypti. Recife, 2013d. 1 Fotografia color.

\_\_\_\_\_. Garrafas impregnadas com inseticidas. Recife, 2013e. 1 Fotografia color.

RODRIGUEZ, M. M. et al. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 39, n. 6, p. 882-888, 2002.

RODRIGUEZ, M. M. et al. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 21, n. 4, p. 437-445, 2005.

RODRIGUEZ, M. M. et al. Resistance to organophosphorus insecticides found in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba, 1997-2009. Revista cubana de medicina tropical, Habana, v. 62, n. 3, p. 217-223, 2010.

RONG, L. S. et al. Insecticide susceptibility status of field-collected *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (L.) at a dengue endemic site in Shah Alam, Selangor, Malaysia. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health, Bangkok, v. 43, n. 1, p. 34-47, 2012.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 7, n. 1, p. 17-23, 2001.

ROUSH, R. T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. Parasitol Today, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 174-179, 1993.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect molecular biology, Oxford, v. 16, n. 6, p. 785-798, 2007.

SANTACOLOMA, L.; CHAVES, B.; BROCHERO, H. L. Susceptibility of natural populations of dengue vector to insecticides in Colombia. Biomedica revista del Instituto Nacional de Salud, Bogota, v. 32, n. 3, p. 333-343, 2012.

SCOTT, J. G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect biochemistry and molecular biology, Oxford, v. 29, n. 9, p. 757-777, 1999.

SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. Pest management science, West Sussex, v. 64, n. 6, p. 610-616, 2008.

SODERLUND, D. M.; KNIPPLE, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect biochemistry and molecular biology, Oxford, v. 33, n. 6, p. 563-577, 2003.

SUMAN, D. S. et al. Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. Acta tropica, Basel, v. 128, n. 1, p. 103-109, 2013.

SURTEES, G. The distribution, density and seasonal prevalence of *Aedes aegypti* in West Africa. Bulletin of the World Health Organization, Geneve, v. 36, n. 4, p. 539-540, 1967.

TOTO, J. C. et al. First report of the oriental mosquito *Aedes albopictus* on the West African island of Bioko, Equatorial Guinea. Medical and veterinary entomology, Oxford, v. 17, n. 3, p. 343-346, 2003.

VAIS, H. et al. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. Pest management science, West Sussex, v. 57, n. 10, p. 877-888, 2001.



VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; HEMINGWAY, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. The Biochemical journal, London, v. 357, pt. 1, p. 65-72, 2001.

WERE, F. The dengue situation in Africa. Paediatrics and international child health, Nairobi, v. 32, suppl. 1, p. 18-21, 2012.

WHEELLOCK, C. E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. Pesticide Science Society of Japan, Tokyo, v. 30, n. 2, p. 75-83, 2005.

YANOLA, J. et al. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, p. 127-131, 2010.

ZEICHNER, B. C.; DEBBOUN, M. The lethal ovitrap: a response to the resurgence of dengue and chikungunya. U.S. Army Medical Department journal, Fort Knox, v. 1, p. 4-11, 2011.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



**Título do Projeto:** Perfil de susceptibilidade da população de *Aedes aegypti* de Cabo Verde a inseticidas químicos.

**Pesquisador responsável:** Hélio Daniel Ribeiro Rocha

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 22/03/2013

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 22/13

**Registro no CAAE:** 14663413.8.0000.5190

### PARECER Nº 18/2013

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 08 de maio de 2013.

  
Janaina Campos de Miranda  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 464777  
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

## APÊNDICE A - Resumo dos principais resultados para os bioensaios

Resumo dos principais resultados para os bioensaios para a população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago

<b>Insecticida Testado</b>	<b>Nº de indivíduos testados</b>	<b>Status</b>
<b><u>Bioensaios</u></b>		
Temephos	2520	Resistente ( $RR_{90}=4$ )
Bti	1620	Susceptível ( $RR_{90}=0,8$ )
Diflubenzuron	1600	$RR_{90}=2,2$
Deltametrina	191	Resistente (mortalidade 72%)
Cipermetrina	163	Resistente (mortalidade 75%)
Malathion	197	Susceptível (mortalidade 100%)
<b><u>Enzimas de detoxificação</u></b>		
GSTs	158	Alterada (25%)
$\alpha$ -esterase	159	Alterada (19%)
$\beta$ -esterase	157	Alterada (17%)
PNPA-esterase	95	Sem alteração (7%)
MFOs	158	Alterada (18%)
<b><u>Insensibilidade ao sítio alvo</u></b>		
Acetilcolinesterase	69	Sem alteração (6%)
<b><u>Mutações do tipo <i>kdr</i> no gene de canal de sódio</u></b>		
Leu982Trp	72	Não detectados
Ile1011Met		
Ile1011Val		
Ile1014Fen		
Val1016Gli		
Val1016Ile		

**Fonte:** Elaborado pelo autor.